

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 1 年   9 月 2 5 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 1 - 2 9 2 6 7 5  
Application Number:  
[ST. 10/C]:      [ J P 2 0 0 1 - 2 9 2 6 7 5 ]

願      人      科学技術振興事業団  
Applicant(s):

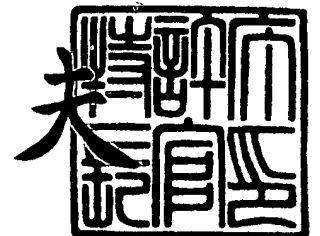
BEST AVAILABLE COPY

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

2 0 0 4 年   4 月 1 3 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 12-470

【提出日】 平成13年 9月25日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61L 27/00  
C12N 5/00

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市竹園 3 - 1 0 8 - 4 0 4

    【氏名】 持立 克身

【特許出願人】

    【識別番号】 396020800

    【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

    【代表者】 沖村 憲樹

【代理人】

    【識別番号】 100107984

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 044347

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

    【包括委任状番号】 0013099

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

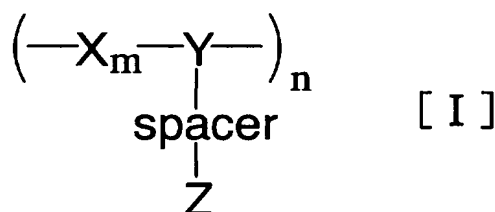
【発明の名称】 基底膜標品又は人工組織

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 分子内に、疎水性を有する直鎖状炭素骨格と、タンパク質と反応しうる官能基とを有する疎水結合性吸着ポリマーを介して、プラスチック表面に仮接着しているタンパク性支持体上に形成されていることを特徴とする基底膜標品又は人工組織。

【請求項 2】 疎水結合性吸着ポリマーが、以下の一般式 [I] で表される疎水結合性吸着ポリマーであることを特徴とする請求項 1 記載の基底膜標品又は人工組織。

【化 1】



(式中、XはCH<sub>2</sub>又はCO-NHを示し、YはCH<sub>2</sub>又はNHCH<sub>2</sub>COを示し、Zは官能基を示し、spacerは(-CH<sub>2</sub>-)<sub>p</sub>又は(-NHCH<sub>2</sub>CO-)<sub>q</sub>を示し、mは1以上の整数を、nは200～450の整数を、p及びqは0又は1～8の整数を示す。)

【請求項 3】 一般式 [I] で表される疎水結合性吸着ポリマーが、メチルビニルエーテルと無水マレイン酸との交互共重合体であることを特徴とする請求項 2 記載の基底膜標品又は人工組織。

【請求項 4】 基底膜標品が、基底膜を介してタンパク性支持体上に接着している基底膜形成能を有する細胞を、該細胞の脂質溶解能を有する溶媒とアルカリ溶液を用いて除去することにより作製された基底膜標品であることを特徴とする請求項 1～3 のいずれか記載の基底膜標品又は人工組織。

【請求項 5】 人工組織が、タンパク性支持体上で、基底膜形成能を有する細胞を培養することにより調製された基底膜であることを特徴とする請求項 1～

4 のいずれか記載の基底膜標品又は人工組織。

【請求項 6】 人工組織が、基底膜形成能を有する細胞の基底面に、基底膜構成成分の集積作用を有するレセプターを局在化させることができる糖鎖を備えたタンパク性支持体上で、基底膜形成能を有する細胞を培養することにより調製された人工組織であることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか記載の基底膜標品又は人工組織。

【請求項 7】 人工組織が、基底膜標品上に所定の基底膜形成能を有する細胞を播種し、培養することにより調製された再構築人工組織であることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか記載の基底膜標品又は人工組織。

【請求項 8】 基底膜形成能を有する細胞が、上皮細胞又は内皮細胞であることを特徴とする請求項 1～7 のいずれか記載の基底膜標品又は人工組織。

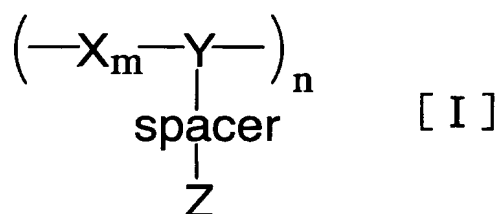
【請求項 9】 タンパク性支持体が、線維芽細胞を包埋したコラーゲンゲルであることを特徴とする請求項 1～8 のいずれか記載の基底膜標品又は人工組織。

【請求項 10】 人工組織が、人工表皮組織、人工角膜上皮組織、人工肺胞上皮組織、人工気道上皮組織、人工腎糸球体組織、人工肝実質組織若しくは人工肺動脈血管内皮組織、又は人工血管、人工肺、人工肝、人工腎臓、人工皮膚若しくは人工角膜であることを特徴とする請求項 1～9 のいずれか記載の基底膜標品又は人工組織。

【請求項 11】 分子内に、疎水性を有する直鎖状炭素骨格と、タンパク質と反応しうる官能基とを有する疎水結合性吸着ポリマーを介して、プラスチック表面にタンパク性支持体を仮接着し、その上に基底膜標品又は人工組織を形成させ、所望時にプラスチック表面から基底膜標品又は人工組織を担持したタンパク性支持体を物理的に剥離させることを特徴とする基底膜の構造を保持したままで移植可能な基底膜標品又は人工組織の製造方法。

【請求項 12】 疎水結合性吸着ポリマーが、以下の一般式 [I] で表される疎水結合性吸着ポリマーであることを特徴とする請求項 11 記載の基底膜の構造を保持したままで移植可能な基底膜標品又は人工組織の製造方法。

【化 2】



(式中、XはCH<sub>2</sub>又はCO-NHを示し、YはCH<sub>2</sub>又はNHCH<sub>2</sub>COを示し、Zは官能基を示し、spacerは(-CH<sub>2</sub>-)<sub>p</sub>又は(-NHCH<sub>2</sub>CO-)<sub>q</sub>を示し、mは1以上の整数を、nは200～450の整数を、p及びqは0又は1～8の整数を示す。)

【請求項13】 一般式 [I] で表される疎水結合性吸着ポリマーが、メチルビニルエーテルと無水マレイン酸との交互共重合体であることを特徴とする請求項12記載の基底膜の構造を保持したままで移植可能な基底膜標品又は人工組織の製造方法。

【請求項14】 基底膜標品が、基底膜を介してタンパク性支持体上に接着している基底膜形成能を有する細胞を、該細胞の脂質溶解能を有する溶媒とアルカリ溶液を用いて除去することにより作製された基底膜標品であることを特徴とする請求項11～13のいずれか記載の基底膜の構造を保持したままで移植可能な基底膜標品又は人工組織の製造方法。

【請求項15】 人工組織が、タンパク性支持体上で、基底膜形成能を有する細胞を培養することにより調製された基底膜であることを特徴とする請求項11～14のいずれか記載の基底膜の構造を保持したままで移植可能な基底膜標品又は人工組織の製造方法。

【請求項16】 人工組織が、基底膜形成能を有する細胞の基底面に、基底膜構成成分の集積作用を有するレセプターを局在化させることができる糖鎖を備えたタンパク性支持体上で、基底膜形成能を有する細胞を培養することにより調製された人工組織であることを特徴とする請求項11～14のいずれか記載の基底膜の構造を保持したままで移植可能な基底膜標品又は人工組織の製造方法。

【請求項17】 人工組織が、基底膜標品上に所定の基底膜形成能を有する

細胞を播種し、培養することにより調製された再構築人工組織であることを特徴とする請求項 11～14 のいずれか記載の基底膜の構造を保持したままで移植可能な基底膜標品又は人工組織の製造方法。

【請求項 18】 基底膜形成能を有する細胞が、上皮細胞又は内皮細胞であることを特徴とする請求項 11～17 のいずれか記載の基底膜の構造を保持したままで移植可能な基底膜標品又は人工組織の製造方法。

【請求項 19】 タンパク性支持体が、線維芽細胞を包埋したコラーゲンゲルであることを特徴とする請求項 11～18 のいずれか記載の基底膜の構造を保持したままで移植可能な基底膜標品又は人工組織の製造方法。

【請求項 20】 人工組織が、人工表皮組織、人工角膜上皮組織、人工肺胞上皮組織、人工気道上皮組織、人工腎糸球体組織、人工肝実質組織若しくは人工肺動脈血管内皮組織、又は人工血管、人工肺、人工肝、人工腎臓、人工皮膚若しくは人工角膜であることを特徴とする請求項 11～19 のいずれか記載の基底膜の構造を保持したままで移植可能な基底膜標品又は人工組織の製造方法。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、プラスチック表面に仮接着しているタンパク性支持体上に形成されている基底膜標品や人工組織、詳しくは、プラスチック表面に吸着しているが、所望時にはプラスチック表面から物理的に剥離させることができるように仮接着しているタンパク性支持体上に形成されている、細胞の形態、分化、増殖、運動、機能発現などを制御する機能を持った細胞外マトリックスである基底膜の標品や、人工血管、人工肺、人工肝、人工腎臓、人工皮膚、人工角膜等の人工組織（組織モデル）及びそれらの製造方法に関する。

##### 【0002】

#### 【従来の技術】

動物の体の内外の表面を覆っている細胞層である表皮、角膜上皮、肺胞上皮、消化器系の粘膜上皮、腎臓子球体上皮、肝実質細胞等の上皮組織は、外界から異物（微生物、アレルゲン、化学物質等）が侵入するのを防いでいる。かかる上皮

組織を構成する上皮細胞の外界面は上端面 (apical)、内側下面は基底面 (basal) と呼ばれ、かかる基底面直下には、蛋白質やプロテオグリカン等の細胞外基質 (ECM) から成る (細胞を含まない) 基底膜と呼ばれる 5 0 ~ 1 0 0 n m の薄膜の構造体が存在する。基底膜は、未成熟な上皮細胞が増殖し、成熟した細胞に分化して、本来の形態や、機能を発現するのに必須の構造体と考えられている。即ち、基底膜なしでは上皮組織は自分自身の維持や本来のパフォーマンスが達成できない。多層又は単層の上皮細胞層はバリアーとして外界からの異物の侵入を防いでいるが、基底膜自体も物理的なバリアーとして作用する。このように、上皮組織を構成する上皮細胞と基底膜が協働して、強固なバリアーを形成し、体内の生命活動を保護している。

#### 【 0 0 0 3 】

上皮細胞の他、内皮細胞、筋細胞、脂肪細胞、シュワン細胞などの実質細胞と結合組織との界面に形成される細胞外基質の特異な膜状構造物である基底膜は、生体の各組織・臓器に普遍的に見い出される一方で、腎糸球体毛細血管ループや神経シナプス膜など高度に特化したものもある。したがって、細胞を間質に接着させるだけでなく、選択的な物質・細胞透過や細胞分化の誘導等の機能が明らかにされている。腎糸球体では、基底膜の陰性荷電が腎のろ過機能を担っているとみなされ、その陰性荷電は現在パールカンとよばれるヘパラン硫酸プロテオグリカン (H S P G) によることが古典的に知られている。H S P G は腎糸球体基底膜だけでなく、種々の基底膜に、IV型コラーゲン、ラミニン、エンタクチン等と同様に、その基本的構成分子としてひろく分布している。

#### 【 0 0 0 4 】

細胞外マトリックス、特に基底膜は、上記のように個体の発生や分化等の生理現象だけでなく、癌の増殖転移や炎症などの病態形成にも深く関与していることが明らかとなりつつあり、その構成タンパク質の機能の解明が重要な課題となってきた。例えば、基底膜の主要糖タンパク質であるラミニンは、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の3種類のサブユニットからなる複合体で、1 5 種類のアイソフォームが知られており、これらが組織特異的あるいは発生時の各段階で特異的に発現している。ラミニンは様々な生物活性を有し、2 0 種類以上のラミニンレセプターが報告さ

れている分子量 90 万の複雑な巨大分子である。

#### 【0005】

細胞が接着可能な薄い細胞外マトリックス層である基底膜の構成成分と上皮細胞との相互作用が、移動、増殖及び分化等の細胞機能に影響を及ぼしている (Crouch et al., Basement membrane. .In The Lung(ed .R. G. Crystal and J. B. West), pp53.1-53.23. Philadelphia : Lippincott-Raven. 1996)。基底膜の主要成分としては、前記のように、ラミニン、IV型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) 及びエンタクチンが知られており (Curr. Opin. Cell Biol. 6, 674-681, 1994)、ラミニン及びIV型コラーゲンのアイソフォームを含む基底膜成分の合成には、間充織細胞が重要な役割を担っていると考えられている (Matrix Biol. 14, 209-211, 1994、J. Biol. Chem. 268, 26033-26036, 1993) が、上皮細胞の役割もまた、重要なものである。HSPGは、上皮細胞由来と考えられているが、ラミニン、IV型コラーゲン及びエンタクチンは、上皮細胞及び間充織細胞の双方によって、インビボで合成される (Development 120, 2003-2014, 1994、Gastroenterology 102, 1835-1845, 1992)。連続した緻密層 (lamina densa) を示すインビトロでの上皮組織モデルを作製する試みが、今まで数多く行われてきた。腸 (J. Cell Biol. 133, 417-430, 1996) 及び皮膚 (J. Invest. Dermatol. 105, 597-601, 1995、J. Invest. Dermatol. 109, 527-533, 1997、Dev. Dynam. 197, 255-267, 1993) 等の組織モデルが研究されており、いくつかの間充織細胞由来基底膜成分が、基底膜形成に重要な役割を果たしていることも見い出されている。

#### 【0006】

従来から、上皮細胞を培養することにより基底膜を構築し、基底面直下に基底膜構造体が存する上皮組織を構築する幾つかの方法が報告されている。例えば、本発明者らは、肺胞上皮細胞と肺線維芽細胞との共培養によりインビトロで基底膜が形成されることを報告した (Cell Struc.Func., 22: 603-614, 1997)。すなわち、肺線維芽細胞をI型コラーゲングルに包埋した状態で順化培養すると、肺線維芽細胞によってコラーゲングルは収縮し堅さを増し、また分泌された細胞外基質が細胞周囲のコラーゲン線維にまわりついて沈着し、その形成物はインビ



ポにおける間質と類似することから擬似間質と呼ばれ、この擬似間質化したI型コラーゲン線維上で、II型肺胞上皮細胞株(SV40-T2)を14日間程度培養する(T2-Fgel)と、肺線維芽細胞が分泌する細胞外基質中のIV型コラーゲンやラミニン等の基底膜構成成分が培地中に拡散して、上記II型肺胞上皮細胞株の基底面に到達し、基底膜構築材料として使われる結果、基底膜構造体が形成されることを報告した。

#### 【0007】

また、希薄な中性コラーゲン溶液を、5%CO<sub>2</sub>中37℃でインキュベートし、コラーゲン線維を形成させた後、無菌状態の中で風を当てて乾燥させた風乾コラーゲン線維基質(fib)を、上記擬似間質の代替物として用い、上記肺胞上皮細胞と肺線維芽細胞との共培養の場合と同様にして、基底膜を形成することも報告されている(Eur. J. Cell Biol., 78: 867-875, 1999, J. Cell Sci., 113: 859-868, 2000)。この方法の場合、コラーゲン溶液の濃度が高いと、形成されたコラーゲン線維に隙間が少なく、あるいはなくなって、基底膜形成のため上皮細胞を長期間培養(10日~2週間)すると、細胞が剥がれて浮き上がることから(例:Becton Dickinson, Fibrillar collagen coat culture insert)、コラーゲン溶液濃度は、0.3~0.5mg/mlが最適であるとされている(Eur. J. Cell Biol., 78: 867-875, 1999, J. Cell Sci., 113: 859-868, 2000)。

#### 【0008】

線維芽細胞を包埋したコラーゲンマトリックスを使用する代わりに、マトリゲル(Matrigel; Becton Dickinsonの登録商標)を加えたコラーゲン線維基質上で、II型肺胞上皮細胞株(SV40-T2)を培養した。このときマトリゲルは、基底膜成分の外來性(exogenous)供給源として機能した。マトリゲルは、Engelbreth-Holm-Swarm腫瘍マトリックスから抽出された基底膜調製物であり(J. Exp. Med. 145, 204-220, 1977)、ECM合成に影響を及ぼす可能性のある種々のサイトカインの他に、ラミニン-1、エンタクチン、IV型コラーゲン、パールカンを含んでいる(Exp. Cell Res. 202, 1-8, 1992)。基底膜に取り込まれたマトリゲルの成分を追跡するために、マトリゲルをビオチンで標識し、基底膜成分であるラミニン、エンタクチン、IV型コラーゲン、パールカンの免疫蛍光染色と電子顕

微鏡観察により、マトリゲル量に依存して基底膜形成が促進し、点状に分泌された基底膜マトリックスがシート状に沈着して基底膜が発達してゆく過程が観察された。その結果、肺胞上皮細胞の下方にて、安定化した外来性ラミニン-1 及びエンタクチンが、インビトロでの上記上皮細胞による基底膜の完全なる発達に大きく関与していることが明らかになっている (J. Cell Sci., 113: 859-868, 2000)。

#### 【0009】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、基底膜や人工組織の調製時にはプラスチック表面に吸着・固定しているが、所望時にはプラスチック表面から物理的に剥離させることができるように仮接着しているタンパク性支持体上に形成されており、基底膜の構造を保持したままで移植が可能なことから、その汎用性が一層高い、細胞の形態、分化、増殖、運動、機能発現などを制御する機能を持った細胞外マトリックスである基底膜の標品、例えば、コラーゲン線維上に形成された基底膜標品や、人工血管、人工肺、人工肝、人工腎臓、人工皮膚、人工角膜等の人工組織や人工臓器、例えば、細胞直下の基質に基底膜構造体を形成させたコラーゲン線維上の人工組織を提供することにある。

#### 【0010】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者は、線維性コラーゲン基質上に肺胞上皮細胞を培養する際に、線維芽細胞の順化、 $TGF-\beta$  又はマトリゲルの存在下で培養することにより、上皮細胞直下の基質に基底膜構造体を形成させる方法等について研究を進め、II型肺胞上皮細胞の場合、図1に示されるように、II型肺胞上皮細胞を、カルチャーインサートの上部ウェルの肺線維芽細胞マトリックス基層（線維芽細胞を包埋したコラーゲングル）上で培養した場合（T2-Fgel）、下部ウェルに肺線維芽細胞マトリックスの共存下、上部ウェルの線維性コラーゲン基層上で培養した場合（T2-fib-Fcm）、下部ウェルにコーティングされたマトリゲルの共存下、上部ウェルの線維性コラーゲン基層上で培養した場合（T2-fib-MG）、上部ウェル及び下部ウェルの成長因子 $TGF-\beta$ の共存下、上部ウェルの線維性コラーゲン基層上で培

養した場合 (T2-fib-TGF $\beta$ ) に基底膜が形成されることを確認した。

#### 【0 0 1 1】

また、内皮細胞の基底面直下に存在する基底膜も、内皮細胞の機能発現と維持に寄与しており、炎症性細胞が血管から組織に侵入する際、あるいはガン細胞が転移する際の障壁の役割を果たしていることから、内皮細胞 (E C) による基底膜の構築についても検討したところ、II型肺胞上皮細胞の場合と異なり、図 2 に示されるように、上部ウェルの線維芽細胞マトリックス基層上で培養した場合 (EC-Fgel)、下部ウェルに肺線維芽細胞マトリックスの共存下、上部ウェルの線維性コラーゲン基層上で培養した場合 (EC -fib-Fcm)、下部ウェルにコーティングされたマトリゲルの共存下、上部ウェルの線維性コラーゲン基層上で培養した場合 (EC-fib-MG)、上部ウェルの線維性コラーゲン基質上で培養した場合 (E C -fib) には、(EC-Fgel) の場合を除き基底膜が形成されなかった。

#### 【0 0 1 2】

さらに、本発明者らは、前記基底膜を形成した肺胞上皮細胞を、0. 1 8 Mの過酸化水素水で10分間処理し、1日間培養を継続すると、自動的に上皮細胞を基底膜から剥離させることができることを報告している (Cell Struc.Func., 22, 603-614, 1997)。しかし、かかる方法では、基底膜からの細胞の剥離が不充分であったり、基底膜の一部が損傷を受けたりする場合があります、かかる基底膜上に所定の基底膜形成能を有する同種又は異種の細胞を播種・培養しても、該細胞の機能発現と維持等十分に生理活性を有する人工ヒト組織を調製することができない場合があることがわかった。そこで、本発明者は、界面活性剤、例えば0. 1 %トリトン (Triton) X-1 0 0 (Calbiochem-Novabiochem Corporation) を用いると、その界面活性作用により細胞の脂質成分が溶解し、アルカリ性溶液、例えば、2 0 ~ 5 0 mMのNH<sub>3</sub>を用いると、細胞の基底膜表面に残存する蛋白質が溶解し、蛋白分解酵素阻害剤の混合液 (P I C、protease inhibitors cocktail) を用いると、細胞が溶解する際に遊離してくるリソゾーム中の蛋白分解酵素等の内因性プロテアーゼ活性による基底膜の分解が抑制され、細胞の形態、分化、増殖、運動、機能発現などを制御する機能を有する基底膜の標品を短期間に得ることができた。かかる基底膜の標品に基底膜形成能を有する同種又は異種の

所望の細胞を播種・培養したところ、生体本来のバリアー機能を備えた人工組織を構築しうることも確認した。

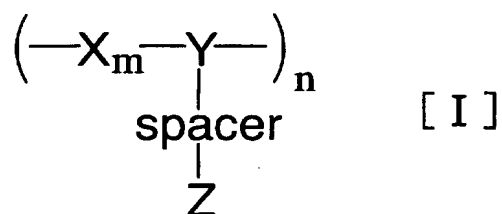
#### 【0013】

以上のようにして調製された人工組織は、生体本来のバリアー機能を備えた細胞層と基底膜構造を有していることから、生体本来のバリアー機能を備えており、組織モデルとして化学物質等の薬理試験、毒性試験等へ有利に応用することができるが、人工組織や基底膜標品を担持した支持体がプラスチック表面に接着した状態で形成されており、接着した状態のままでは再生医療材料として移植することができず、プラスチック表面から機械的に剥がすと基底膜の構造が崩れてしまい、生体本来のバリアー機能等の生理活性を有する組織として使用することはできないが、メチルビニルエーテルと無水マレイン酸との交互共重合体等の分子内に疎水性を有する直鎖状炭素骨格とタンパク質と反応しうる官能基とを有する疎水結合性吸着ポリマーを介して、プラスチック表面にタンパク性支持体を仮接着し、その上に人工組織や基底膜標品を形成させると、所望時にプラスチック表面から人工組織や基底膜標品を担持したタンパク性支持体を物理的に剥離させることができ、剥離された人工組織や基底膜標品を担持したタンパク性支持体は、基底膜の構造を保持したままで移植が可能なことを見い出し、本発明を完成するに至った。

#### 【0014】

すなわち本発明は、分子内に、疎水性を有する直鎖状炭素骨格と、タンパク質と反応しうる官能基とを有する疎水結合性吸着ポリマーを介して、プラスチック表面に仮接着しているタンパク性支持体上に形成されていることを特徴とする基底膜標品又は人工組織（請求項1）や、疎水結合性吸着ポリマーが、以下の一般式〔I〕で表される疎水結合性吸着ポリマーであることを特徴とする請求項1記載の基底膜標品又は人工組織

## 【化 3】



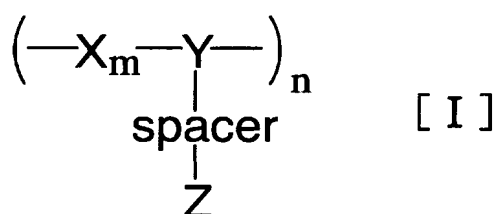
(式中、XはCH<sub>2</sub>又はCO-NHを示し、YはCH<sub>2</sub>又はNHCH<sub>2</sub>COを示し、Zは官能基を示し、spacerは(-CH<sub>2</sub>-)<sub>p</sub>又は(-NHCH<sub>2</sub>CO-)<sub>q</sub>を示し、mは1以上の整数を、nは200～450の整数を、p及びqは0又は1～8の整数を示す。)(請求項2)や、一般式[I]で表される疎水結合性吸着ポリマーが、メチルビニルエーテルと無水マレイン酸との交互共重合体であることを特徴とする請求項2記載の基底膜標品又は人工組織(請求項3)や、基底膜標品が、基底膜を介してタンパク性支持体上に接着している基底膜形成能を有する細胞を、該細胞の脂質溶解能を有する溶媒とアルカリ溶液を用いて除去することにより作製された基底膜標品であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の基底膜標品又は人工組織(請求項4)や、人工組織が、タンパク性支持体上で、基底膜形成能を有する細胞を培養することにより調製された基底膜であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の基底膜標品又は人工組織(請求項5)や、人工組織が、基底膜形成能を有する細胞の基底面に、基底膜構成成分の集積作用を有するレセプターを局在化させることができる糖鎖を備えたタンパク性支持体上で、基底膜形成能を有する細胞を培養することにより調製された人工組織であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の基底膜標品又は人工組織(請求項6)や、人工組織が、基底膜標品上に所定の基底膜形成能を有する細胞を播種し、培養することにより調製された再構築人工組織であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の基底膜標品又は人工組織(請求項7)や、基底膜形成能を有する細胞が、上皮細胞又は内皮細胞であることを特徴とする請求項1～7のいずれか記載の基底膜標品又は人工組織(請求項8)や、タンパク性支持体が、線維芽細胞を包埋したコラーゲングルであることを特徴とする請求項1～8のいずれか記載の基底膜標品又は人工組織(請求項9)や、人工組織が、人

工表皮組織、人工角膜上皮組織、人工肺胞上皮組織、人工気道上皮組織、人工腎糸球体組織、人工肝実質組織若しくは人工肺動脈血管内皮組織、又は人工血管、人工肺、人工肝、人工腎臓、人工皮膚若しくは人工角膜であることを特徴とする請求項 1～9 のいずれか記載の基底膜標品又は人工組織（請求項 10）に関する。

### 【0015】

また本発明は、分子内に、疎水性を有する直鎖状炭素骨格と、タンパク質と反応しうる官能基とを有する疎水結合性吸着ポリマーを介して、プラスチック表面にタンパク性支持体を仮接着し、その上に基底膜標品又は人工組織を形成させ、所望時にプラスチック表面から基底膜標品又は人工組織を担持したタンパク性支持体を物理的に剥離させることを特徴とする基底膜の構造を保持したままで移植可能な基底膜標品又は人工組織の製造方法（請求項 11）や、疎水結合性吸着ポリマーが、以下の一般式 [I] で表される疎水結合性吸着ポリマーであることを特徴とする請求項 11 記載の基底膜の構造を保持したままで移植可能な基底膜標品又は人工組織の製造方法

### 【化 4】



（式中、XはCH<sub>2</sub>又はCO-NHを示し、YはCH<sub>2</sub>又はNHCH<sub>2</sub>COを示し、Zは官能基を示し、spacerは(−CH<sub>2</sub>−)<sub>p</sub>又は(−NHCH<sub>2</sub>CO−)<sub>q</sub>を示し、mは1以上の整数を、nは200～450の整数を、p及びqは0又は1～8の整数を示す。）（請求項 12）や、一般式 [I] で表される疎水結合性吸着ポリマーが、メチルビニルエーテルと無水マレイン酸との交互共重合体であることを特徴とする請求項 12 記載の基底膜の構造を保持したままで移植可能な基底膜標品又は人工組織の製造方法（請求項 13）や、基底膜標品が、基底膜を介してタンパク性支持体上に接着している基底膜形成能を有する細胞を、該細胞の脂質溶

解能を有する溶媒とアルカリ溶液を用いて除去することにより作製された基底膜標品であることを特徴とする請求項 11～13 のいずれか記載の基底膜の構造を保持したままで移植可能な基底膜標品又は人工組織の製造方法（請求項 14）や、人工組織が、タンパク性支持体上で、基底膜形成能を有する細胞を培養することにより調製された基底膜であることを特徴とする請求項 11～14 のいずれか記載の基底膜の構造を保持したままで移植可能な基底膜標品又は人工組織の製造方法（請求項 15）や、人工組織が、基底膜形成能を有する細胞の基底面に、基底膜構成成分の集積作用を有するレセプターを局在化させることができる糖鎖を備えたタンパク性支持体上で、基底膜形成能を有する細胞を培養することにより調製された人工組織であることを特徴とする請求項 11～14 のいずれか記載の基底膜の構造を保持したままで移植可能な基底膜標品又は人工組織の製造方法（請求項 16）や、人工組織が、基底膜標品上に所定の基底膜形成能を有する細胞を播種し、培養することにより調製された再構築人工組織であることを特徴とする請求項 11～14 のいずれか記載の基底膜の構造を保持したままで移植可能な基底膜標品又は人工組織の製造方法（請求項 17）や、基底膜形成能を有する細胞が、上皮細胞又は内皮細胞であることを特徴とする請求項 11～17 のいずれか記載の基底膜の構造を保持したままで移植可能な基底膜標品又は人工組織の製造方法（請求項 18）や、タンパク性支持体が、線維芽細胞を包埋したコラーゲンゲルであることを特徴とする請求項 11～18 のいずれか記載の基底膜の構造を保持したままで移植可能な基底膜標品又は人工組織の製造方法（請求項 19）や、人工組織が、人工表皮組織、人工角膜上皮組織、人工肺胞上皮組織、人工気道上皮組織、人工腎糸球体組織、人工肝実質組織若しくは人工肺動脈血管内皮組織、又は人工血管、人工肺、人工肝、人工腎臓、人工皮膚若しくは人工角膜であることを特徴とする請求項 11～19 のいずれか記載の基底膜の構造を保持したままで移植可能な基底膜標品又は人工組織の製造方法（請求項 20）に関する。

#### 【0016】

##### 【発明の実施の形態】

本発明の基底膜標品又は人工組織としては、分子内に、疎水性を有する直鎖状炭素骨格と、タンパク質と反応しうる官能基とを有する疎水結合性吸着ポリマー

を介して、プラスチック表面に仮接着しているタンパク性支持体上に形成されている基底膜標品や人工組織であればどのようなものでもよく、また、本発明の基底膜の構造を保持したままで移植可能な基底膜標品又は人工組織の製造方法としては、分子内に疎水性を有する直鎖状炭素骨格とタンパク質と反応しうる官能基とを有する疎水結合性吸着ポリマーを介して、プラスチック表面にタンパク性支持体を仮接着し、その上に基底膜標品又は人工組織を形成させ、所望時にプラスチック表面から基底膜標品又は人工組織を担持したタンパク性支持体を物理的に剥離させる方法であれば特に制限されるものではない。上記疎水結合性吸着ポリマーとしては、上記一般式 [I] (式中、Xは $\text{CH}_2$ 又は $\text{CO-NH}$ を示し、Yは $\text{CH}_2$ 又は $\text{NHCH}_2\text{CO}$ を示し、Zは官能基を示し、spacerは $(-\text{CH}_2-)_p$ 又は $(-\text{NHCH}_2\text{CO}-)_q$ を示し、mは1以上の整数を、nは200～450の整数を、p及びqは0又は1～8の整数を示す。) で表され、プラスチック表面に吸着することができる疎水結合性吸着ポリマー等の、分子内にポリビニール鎖、直鎖状アミノ酸ポリマー (ポリグリシン、ポリアラニン等) などの疎水性の直鎖状骨格をもつ疎水結合性吸着ポリマーで、該疎水性の直鎖状骨格に直接、あるいは、スペーサーを介してタンパク性支持体と反応できる反応性の官能基 (反応基) とを有する疎水結合性吸着ポリマーを好適に用いることができる。

#### 【0017】

上記反応基としては、タンパク性支持体の官能基と反応して、結合しうるものであれば特に制限されるものではなく、無水カルボン酸型の反応基、アミノ基、SH基等を例示することができる。上記無水カルボン酸型の反応基としては、無水マレイン酸基を好適に例示することができ、タンパク質のN末端アミノ基、リジンε-アミノ基、SH基等の官能基と結合する。上記アミノ基はタンパク質のカルボキシル基と反応するが、化学結合とするためペプチド縮合剤を添加することが好ましい。上記SH基はタンパク質のSH基と主として反応し、時には、S-S結合とSS交換反応で結合することもある。そして、かかるSH基に、前記疎水性の直鎖状骨格とコポリマーを形成することができる範囲内で、簡単に外れる可逆的な保護基をつけることもできる。

#### 【0018】



かかる反応基を有する疎水結合性吸着ポリマーとして、メチルビニルエーテルと無水マレイン酸との交互共重合体であるMMA C (methyl vinyl ether / maleic anhydride copolymer) を具体的に挙げることができ、MMA Cの場合、メチレン基を骨格とする直鎖ポリマーが、プラスチック表面に疎水性結合で吸着することを可能にしているが、 $-CH_2-CH_2-$ 骨格だけだとあまりにも疎水性で、水との親和性が低くなり、微視的には水をはじいて、反応性に支障がでる可能性があり、そこで、メチレン基のH原子の一部を $CH_3O$ 基で置換し、O原子の存在により反応効率が高まると考えられる。なお、 $CH_3O$ 基に代えてOH基で置換すると、分子間で無水カルボン酸とエステル結合を作ることから好ましくない。またMMA Cは、エタノールに可溶のため、アセトン等を必要とするポリマーよりも使い易い上に、塗布後に速やかに風乾できる。また、エタノール溶液等としてプラスチック表面のコーティング処理に用いる場合のMMA C濃度としては、 $2\mu g/ml \sim 1mg/ml$ 、特に $10\mu g/ml$ が好適であり、かかるコーティング処理を所望する仮接着の程度に応じて1～3回繰り返すこともできる。そして、MMA Cにおける反応基である無水マレイン酸は、コラーゲン等のタンパク質のアミノ基と結合することになるが、この無水マレイン酸がたとえ水と反応してカルボン酸になったとしても、タンパク質の+の電荷とイオン結合することができる。

#### 【0019】

そして、上記疎水結合性吸着ポリマーは、疎水性の直鎖状骨格により、化学結合でなく疎水性結合でプラスチック表面に吸着されることから、プラスチックの種類や材質に関係なく吸着することができ、かかる疎水結合性吸着ポリマーを介して、プラスチック表面にタンパク性支持体を仮接着し、その上に人工組織や基底膜標品を形成させると、所望時にプラスチック表面から人工組織や基底膜標品を担持したタンパク性支持体を物理的に剥離させることができ、剥離された人工組織や基底膜標品を担持したタンパク性支持体は、基底膜の構造を保持したまま移植が可能なることから、その汎用性が一層高く、その適用例として、内径3mm以下の微細人工血管や、体内埋込み型のヒト人工組織等を例示することができ、特に、人工子球体、人工肝臓、人工肺胞など上皮組織と内皮組織が近接する組

織や臓器を好適に例示することができる。

#### 【0020】

また、上記タンパク性支持体としては、線維芽細胞を包埋したコラーゲングル（線維性コラーゲンマトリックス）等のコラーゲン線維の他、（合成）エラスチンポリマー、コラーゲン線維と（合成）エラスチンポリマーとの混合物等を挙げることができるが、栄養塩、老廃物の拡散を確保する点で線維性コラーゲンマトリックスが好ましく、かかる線維性コラーゲンマトリックスとしては、線維芽細胞によって収縮されるコラーゲングルの高密度マトリックスを用いることもできる。この場合、コラーゲンの生合成を高めるため、ascorbic acid-2-phosphate（A s c - P）を添加することもできる。中性 I 型コラーゲン溶液を CO<sub>2</sub> インキュベーター内で静置してインキュベートし、ポリマー化したゲルを、室温下に風乾した線維性コラーゲンマトリックスを用いることもできる。

#### 【0021】

タンパク性支持体上に形成される基底膜標品としては、その上に、基底膜形成能を有する同種又は異種の所望の細胞を播種・培養した場合に、細胞の形態、分化、増殖、運動、機能発現などを制御する機能を有する基底膜の標品であればどのようなものでもよく、上記基底膜形成能を有する細胞としては上皮細胞、内皮細胞、間充織細胞などを挙げることができ、上記上皮細胞としては表皮細胞、角膜上皮細胞、肺胞上皮細胞、消化器系の粘膜上皮細胞、腎臓子球体上皮細胞、肝実質細胞等を、上記内皮細胞としては腎臓子球体毛細血管内皮細胞、肺動脈血管内皮細胞、胎盤静脈血管内皮細胞、大動脈血管内皮細胞等を、間充織細胞としては筋細胞、脂肪細胞、グリア細胞、シュワン細胞等をより具体的に例示することができる。また、タンパク性支持体上に形成されるヒト等の人工組織（人工臓器も含む）としては、細胞層とその直下の基底膜を含む組織であればどのようなものでもよいが、例えば、人工表皮組織、人工角膜上皮組織、人工肺胞上皮組織、人工気道上皮組織、人工腎系球体組織、人工肝実質組織、人工肺動脈血管内皮組織等の人工組織や、人工血管、人工肺、人工肝、人工腎臓、人工皮膚、人工角膜等の人工臓器を具体的に挙げることができる。

#### 【0022】

基底膜標品の作製方法としては、過酸化水素水で処理する等の前記従来公知の方法をも含め特に制限されないが、本発明者により新たに開発された基底膜標品の作製方法、すなわち、基底膜を介して支持体上に接着している基底膜形成能を有する細胞を、該細胞の脂質溶解能を有する溶媒とアルカリ溶液を用いて除去する基底膜標品の作製方法、好ましくは脂質溶解能を有する溶媒を用いて脱脂処理をした後、又は脱脂処理と同時にアルカリ溶液を用いて除タンパク・除核処理をする基底膜標品の作製方法を特に好適に挙げることができる。

### 【0023】

上記細胞の脂質溶解能を有する溶媒としては、界面活性剤や有機溶媒等の上皮細胞や内皮細胞の脂質を溶解しうる溶媒であれば制限されるものはないが、トリトン X-100、Lubrol PX、デオキシコール酸、コール酸、Tween、エマルゲン等の界面活性剤が好ましく、中でもトリトン X-100 が特に好ましい。界面活性剤等の脂質溶解能を有する溶媒の使用濃度としては、適用する細胞の種類や処理時間にもよるが、例えばトリトン X-100 の場合、0.01～1.0%、特に0.1%前後が好ましい。また、上記アルカリ溶液としては、細胞の基底膜表面に残存する蛋白質を溶解し、基底膜の蛋白までは溶解しないアルカリ溶液であればどのようなものでもよいが、pH 9～10 のアルカリ溶液が好ましく、例えば、20～50 mM の  $\text{NH}_3$  や 1 mM の  $\text{NaOH}$  等のアルカリ性溶液を具体的に挙げることができる。

### 【0024】

さらに、細胞が溶解する際に遊離してくるリソゾーム中の DNase I 等の蛋白分解酵素などの内因性プロテアーゼ活性による基底膜の分解を抑制するため、プロテアーゼ阻害剤、好ましくは蛋白分解酵素阻害剤の混合液 (PIC、protease inhibitors cocktail) を添加したリン酸緩衝液中で行う方法が好ましい。さらに、基底膜標品の作製方法においては、人工ヒト組織等の基底膜を介して支持体上に接着している基底膜形成能を有する細胞にあらかじめ 2 mM の  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  等のバナジウム塩を用いて前処理することもできる。バナジウム塩を用いて前処理すると、基底膜から細胞の剥離がよくなるが、バナジウム塩の洗浄が必要となる。

## 【0025】

また、タンパク性支持体上に形成されるヒト等の人工組織の調製方法としては、公知の人工組織の調製方法の他、本発明者により開発された新たな調製方法を挙げることができる。上記公知の人工組織の調製方法としては、図1に示されるように、上皮細胞を、カルチャーインサートの上部ウェルの肺線維芽細胞マトリックス基層上で培養した人工組織 (T2-Fgel) の調製方法、下部ウェルに肺線維芽細胞マトリックスの共存下、上部ウェルの線維性コラーゲン基層上で培養した人工組織 (T2-fib-Fcm) の調製方法、下部ウェルにコーティングされたマトリゲルの共存下、上部ウェルの線維性コラーゲン基層上で培養した人工組織 (T2-fib-MG) の調製方法、上部ウェル及び下部ウェルの成長因子  $TGF-\beta$  の共存下、上部ウェルの線維性コラーゲン基層上で培養した人工組織 (T2-fib-TGF  $\beta$ ) の調製方法を好適に挙げることができる。また、図2に示されるように、内皮細胞をカルチャーインサートの上部ウェルの肺線維芽細胞マトリックス基層上で培養した新規人工組織 (EC-Fgel) の調製方法を好適に挙げることができる。

## 【0026】

ところで、基底膜の調製には、ラミニン、IV型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG)、エンタクチン等の基底膜構成成分が必要とされ、また個々の基底膜形成能を有する細胞は基底膜構成成分を分泌するが、かかる細胞から分泌される基底膜構成成分は、細胞の基底面 (下面) から線維性コラーゲンマトリックスが形成する細胞外基質の内部に向かって分泌される。したがって、分泌された基底膜成分の大部分は基底面表面から離れてしまい反対側から培地中に拡散したり、途中で蛋白質分解酵素に分解されたりして、通常有効利用されない。しかし、基底膜形成能を有する細胞の基底面に、基底膜構成成分の集積作用を有するレセプターを局在化させることができる糖鎖を備えた支持体上で、基底膜形成能を有する細胞を培養することにより、上記上皮細胞や内皮細胞などの基底膜形成能を有する細胞から分泌される内生の基底膜構成成分を好適に活用することができる。すなわち、本発明者により開発された新たな人工組織の調製方法として、基底膜形成能を有する細胞の基底面に、基底膜構成成分の集積作用を有するレセプターを局在化させることができる糖鎖を備えた支持体上で、基底膜形

成能を有する細胞を培養することにより人工組織を調製する方法を挙げることができる。

#### 【0027】

そして、上記新たな人工組織の調製方法においては、基底膜形成能を有する細胞から分泌される内生の基底膜構成成分に加えて、外生の基底膜構成成分等をも利用して短期間で人工組織を調製することができるように、基底膜構成成分及び TGF- $\beta$  を分泌する線維芽細胞、好ましくは線維芽細胞の順化培地や、基底膜構成成分を豊富に含有するマトリゲルなどの線維芽細胞代替物と共培養することもできる。また、同様に短期間で人工組織を調製することができるように、基底膜形成能を有する細胞を、別途調製されたラミニン、IV型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG)、エンタクチン等の基底膜構成成分の1種又は2種以上の存在下で培養したり、TGF- $\beta$  の存在下で培養することもできる。上記ラミニンやHSPGは市販品が用いることができ、IV型コラーゲンとしては、牛レンズカプセルから酢酸抽出したものを有利に用いることができる。上記ラミニン、IV型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG)、エンタクチン等の基底膜構成成分やTGF- $\beta$  を用いる方法は、コスト高になることから、基底膜形成能を有する細胞や線維芽細胞として、基底膜構成成分の1種又は2種以上の遺伝子が導入された基底膜構成成分高発現細胞や、TGF- $\beta$  の遺伝子が導入された成長因子高発現細胞を選抜・使用することができる。

#### 【0028】

上記基底膜形成能を有する細胞の基底面に、基底膜構成成分の集積作用を有するレセプターを局在化させることができる糖鎖としては、糖鎖又は該糖鎖の一部が上記レセプターと結合することにより、基底膜形成能を有する細胞を支持体上に接着しうる糖鎖、中でも、レセプターと結合する糖鎖又は該糖鎖の一部が前記基底膜構成成分と置換しうる糖鎖を用いることが好ましい。また、糖鎖を備えた支持体としては、かかる糖鎖を有する一体成形体、あるいは、糖鎖を有するポリマーをコーティングした支持体であることが好ましく、該糖鎖を有するポリマーとしては、 $\beta$ -D-グルコピラノース ( $\beta$ -D-glucopyranosyl) 非還元末端又は2-アセトアミド-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコピラノース (2-acetoamide-2

-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl) 非還元末端を有する糖鎖を有するポリマーを例示することができる。また、かかる $\beta$ -D-グルコピラノース非還元末端を有する糖鎖を有するポリマーとしてはPV-CAやPV-Lam等、2-アセトアミド-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコピラノース非還元末端を有する糖鎖を有するポリマーとしてはPV-GlcNAc等のビニル系モノマーにオリゴ糖を導入した高分子ポリマー (PV-sugar) をより具体的に例示することができる。そして、これらPV-sugarは1種単独の他、2種以上の混合物を用いてもよく、これらPV-sugarは市販のものを用いることができる。

### 【0029】

また、本発明者により開発された新たな方法による人工組織の他の態様としては、支持体の相対する2つの基層面上で、基底膜形成能を有する細胞を培養する方法を挙げることができ、例えば、多孔性メンブレン膜の両側に線維性コラーゲンを作製し、その両側に上皮細胞と血管内皮細胞の組み合わせなど、2種類の基底膜形成能を有する細胞を播種・培養すると、基底膜形成能を有する細胞から分泌される内生の基底膜構成成分の拡散が防止され、基底膜成分の有効利用率を高めることができる。すなわち、一方の細胞が分泌する基底膜構成成分が、線維性コラーゲンの反対側に位置する他方の細胞に辿り着き、かかる細胞が形成する細胞-細胞間結合（密着結合）で隙間の無い障壁により阻まれて、培地中に拡散することがなく、その結果、基底膜成分の有効利用率を高めることができる。図3の上段には、コラーゲンゲル包埋線維芽細胞存在下、コラーゲン線維を介しての上皮細胞と血管内皮細胞の共培養による基底膜の形成（左）、糖鎖を備えた支持体であるコラーゲン線維の薄膜を介しての上皮細胞と血管内皮細胞の共培養による基底膜の形成（中）、コラーゲン線維を介しての上皮細胞と線維芽細胞の共培養による基底膜の形成（右）が模式的に示されており、また、図3の下段には、所望の細胞組織ではない方の細胞組織、すなわち、血管内皮組織（左）、上皮組織（中）、線維芽細胞（右）を機械的に剥がして取り除いた状態が示されている。これら細胞の組合せとしては、上皮細胞と血管内皮細胞、上皮細胞と上皮細胞、内皮細胞と内皮細胞、上皮細胞又は内皮細胞と一部の間充織細胞等が考えられる。

**【0030】**

さらに、タンパク性支持体上に形成されるヒト等の人工組織の他の態様として再構築人工組織を挙げることができ、かかる再構築人工組織の製造方法としては、前記基底膜標品上に所定の基底膜形成能を有する細胞を播種し、培養する方法であれば特に制限されるものではなく、基底膜標品と由来を異にする基底膜形成能を有する細胞も、基底膜標品と由来を同じくする基底膜形成能を有する細胞と同様に用いることができる。具体的には、上皮細胞や内皮細胞等が剥離され、基底膜が露出した基底膜標品、例えば、上皮細胞や内皮細胞等が形成した基底膜構造体とコラーゲン線維等の支持材からなる上記基底膜標品は、他の細胞の培養に利用することができる（図4参照）。

**【0031】**

上皮の基底膜と内皮の基底膜とは同じものとはいえないものの構成成分の多くが共通し、上皮細胞が形成した基底膜を内皮組織の構築に転用することができ、例えば、基底膜標品上に目的とするヒト上皮細胞やヒト内皮細胞を播種し、培養するだけでヒト上皮組織やヒト内皮組織を再構築することができる。実際、肺胞II型上皮細胞が形成した基底膜上に肺動脈内皮細胞を播種・培養し、肺動脈内皮組織を構築できることを確認している。基底膜構造体上に上皮細胞ないし血管内皮細胞を播種し、新たな組織を形成させる際、目的とする組織や臓器の間質細胞（線維芽細胞）を共存させると、基底膜の新陳代謝が円滑になることから好ましい。また、基底膜は、細胞が接着した状態では保存出来ないが、細胞が除去され非細胞成分のみで構成される基底膜標品は、保存が容易であり、必要時に、何時でも、何処でも使用できるという利点を有する。そして、基底膜標品の保存は、冷蔵でも冷凍でも全く問題がなく行うことができる。

**【0032】**

上記のように、基底膜標品を利用した上皮組織や内皮組織などの再構築方法は汎用性が高く、例えば、ラットの肺胞上皮細胞を用いて作製した基底膜はヒト組織の再構築にも使用することが可能であり、また、かかるラット肺胞上皮細胞由来の基底膜から再構築される臓器や組織も肺胞に限定されるものではない。これに対し、個々の臓器の上皮細胞や内皮細胞を培養して基底膜を形成させ、上皮組

組織や内皮組織などを構築する場合には、個々の細胞に応じた培養系を開発するのに、多くの時間と労力が必要であり、また、それぞれの組織用に基底膜を個別に用意するのでは無駄が多いが、上記のように、基底膜標品を組織再構築用共通ベース資材として使うことによって、効率よく本発明の再構築人工組織を作製することができる。そして、基底膜標品を利用して上皮組織や内皮組織などを再構築する場合の培養容器としては特に制限されず、カルチャーインサート方式の他、ホロファーバー方式にも応用することができ、例えば、人工血管に適用する場合は、人工血管における問題点である血栓の発生を防止することができ、また、人工透析に適用する場合は、患者への負担が軽減できる。

### 【0033】

このように、基底膜標品から再構築された本発明の組織モデルや臓器モデルも、従前の組織モデルと同様に、生体本来のバリアー機能を備えた細胞層と基底膜構造を有していることから、生体本来のバリアー機能を備えており、化学物質等の薬理試験、毒性試験等へ有利に応用することができる。例えば、被検物質を上皮組織モデルの細胞層上に存在せしめ、上皮細胞の上面と基底面間の電気抵抗を測定することにより、上皮組織に対する被検物質の安全性や毒性を試験することができる。被検物質により肺胞上皮組織に軽微だが傷害が生ずれば、電気抵抗が低下することから、被検物質の安全性や毒性を評価することができる。また、被検物質を上皮組織モデルの細胞層上に存在せしめ、上皮細胞や基底膜の状態を走査型電子顕微鏡や透過型電子顕微鏡で観察することにより、上皮組織に対する被検物質の安全性や毒性を試験することができる。

### 【0034】

#### 【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 実施例 1（基底膜を形成する上皮細胞・内皮細胞等）

上皮細胞として、Dr. A. Clement, Hopital Armand Trousseau, Paris (Clement et al., Exp. Cell Res., 196: 198-205, 1991) から供与された肺胞II型上皮細胞（SV40-ラージT抗原遺伝子をトランスフェクトしたラットから採取；



T2細胞)を、10 mMの2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸(HEPES)(pH 7.2)、10%ウシ胎児血清(FBS; Hyclone Laboratories Inc., Logan, Utah)、ペニシリン及びストレプトマイシンを添加したDMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)において、空気95%/CO<sub>2</sub>5%の大気条件下で培養して用いた。また、内皮細胞として、クローンテックス(Clonetics)社から購入したヒト肺動脈血管内皮細胞(HPAE細胞)を、10 mMのHEPES(pH 7.2)、2%FBS、成長因子、ペニシリン及びストレプトマイシンを添加したMCDB131単独又はMCDB131とDMEMの等量混合培地において、空気95%/CO<sub>2</sub>5%の大気条件下で培養して用いた。線維芽細胞は、雄ラットJcl:Fischer 344由来の肺線維芽細胞を文献(CELL STRUCTURE AND FUNCTION 22: 603-614, 1997)記載の方法に準じて調製したもの、及び、クローンテックス社から購入したヒト肺線維芽細胞を用いた。

### 【0035】

#### 実施例2 (線維性コラーゲンゲルの調製)

コラーゲンゲル線維を、通常線維芽細胞によって構築されるコラーゲンゲルの密度マトリックスを模して調製した。DMEM(pH 7.2)における中性I型コラーゲン溶液(0.42 mlのウシ真皮から酸抽出で採った0.3~0.5 mg/mlのI型コラーゲン; Koken Co., Tokyo)を、6ウェル培養プレート(Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ)のポリエチレンテレフタル酸エステル膜と共に、4.3 cm<sup>2</sup>の培養線維芽細胞層に投入し、CO<sub>2</sub>インキュベーターで、数時間~24時間インキュベートし、ゲル化した。このゲルを、室温下24~48時間風乾して圧縮し、高密度コラーゲン線維(fib)として使用した。上記線維芽細胞としては、雄ラットJcl:Fischer 344由来の肺線維芽細胞を文献(CELL STRUCTURE AND FUNCTION 22: 603-614, 1997)記載の方法に準じて調製した。

### 【0036】

#### 実施例3 (組織モデルの構築1)

肺胞II型上皮細胞及び血管内皮細胞層の直下に基底膜を有する上皮組織及び内

皮組織の形成法を、それぞれ図1及び図2に示した。最も基本的な組織モデルの構築するために、線維芽細胞を包埋したコラーゲンゲル上に直接上記上皮細胞 (T2) 又は内皮細胞 (HPAEC) を播種し2週間培養した (図1のT2-Fgel, 図2のEC-Fgel)。また、上記fibを培養基質に用いて基底膜を有する上皮組織及び内皮組織を形成するために、fib上に直接上皮細胞 (T2) 又は内皮細胞 (HPAEC) を播種し2週間培養した (図1のT2-fib-Fcm、T2-fib-MGとT2-fib-TGF $\beta$ )。図1において、Fcmは、線維芽細胞を包埋したコラーゲンゲル (Fgel) との共培養、MGは、マトリゲル200 $\mu$ l (ベクトンディッキンソン社製) を培養皿底にコーティングした培養、TGF $\beta$ は、1ng/mlのTGF $\beta$ 添加した培養を示す。

### 【0037】

#### 実施例4 (組織モデルの構築2)

##### 4-1 (上皮細胞・内皮細胞におけるレセプターの存在の確認)

10 $\mu$ g/ml濃度の各種PV-Sugar (生化学工業社製) を、製造者のプロトコールに従い、96穴ポリスチレン製プレート (ベクトンディッキンソン社製) にコーティングし、その上にラット肺胞II型上皮細胞を $1 \times 10^4$ 個まき、10mM HEPES (pH7.2) と1% FBSを添加したDMEM中、CO<sub>2</sub>インキュベーターで37℃、24~48時間インキュベートした。インキュベート後、クリスタルバイオレットで細胞を染色し、595nmの吸光度を測定して細胞数とすることにより、各種PV-Sugarとの接着性について調べた。また、細胞接着因子のファイブロネクチン (FN) 及びビトロネクチン (VN) コートに対する細胞接着も同時に行い、対照実験とした。結果を図5に示す。図5の横軸には、種々の非還元末端糖鎖のPV-sugar (GlcNAc; 2-acetoamide-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranosyl、Lam;  $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)、CA;  $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)、LA;  $\beta$ -D-galactopyranosyl、MA;  $\alpha$ -D-glucopyranosyl、Man;  $\beta$ -D-mannopyranosyl、MEA;  $\alpha$ -D-galactopyranosyl) が示されている。図5から、肺胞II型上皮細胞は、2-アセトアミド-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコピラノース非還元末端を有する糖鎖をもつPV-GlcNAc、 $\beta$ -D-グルコピラノース非還元末端を有する糖鎖をもつPV-CAやPV-Lam、 $\beta$ -D-ガラクトピラノース非還元末端を有す

る糖鎖をもつPV-LAに対し強い接着を示すことがわかった。これらの結果から、肺胞II型上皮細胞は、その基底面にこれら糖鎖に対するレセプターを発現することが示された。

### 【0038】

#### 4-2 (肺胞II型上皮細胞による基底膜の調製)

基底膜の調製には、下部ウェルと、該下部ウェルに同心円上に収納され、底部にPET膜を有する上部ウェルからなるカルチャーインサートを用いた(図1を参照)。上部ウェルの底部PET膜上に、実施例3で示した方法で作製した高密度コラーゲン線維(fib)にDMEMに溶解した $10\mu\text{g/ml}$ 濃度のPV-GlcNAc、PV-CA又はPV-Lamをコーティングした支持体(fib\*)上で、肺胞II型上皮細胞を $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ 存在下で2週間培養した。この培養では、線維芽細胞を包埋したコラーゲングル(Fgel)、マトリゲル(MG)又は $\text{TGF}\beta$ を培養系に添加せず、培養液には $10\text{mM}$ のHEPES(pH7.2)、 $1\%\text{FBS}$ と $0.2\text{mM}$  ascorbic acid-2-phosphate(Asc-P)を添加したDMEMを用いた。形成された肺胞上皮組織の透過型電子顕微鏡写真を図6に、形成された肺胞上皮組織の表面の肺胞II型上皮細胞層を実施例5(後述)に示す方法で除去し、露出した肺胞上皮組織直下の細胞外基質の走査型電子顕微鏡写真を図7に示す。

### 【0039】

図6中、太矢印は基底膜緻密板(lamina densa)を、細矢印は培養初期に形成され、一部は分解されつつある旧基底膜を、鏝は基底膜が形成されていない領域をそれぞれ示す(スケールの長さは $1\mu\text{m}$ )。また図7のPV-sugar未処理(Cont)では、既存のfib(コラーゲン線維、白抜き太矢印)に上皮細胞の分泌物が集積している個所(\*)が認められるにすぎないが、PV-GlcNAc、PV-Lam、PV-CA処理では、基底膜が平面状(図6の太矢印に対応)に形成されており、PV-Lam処理では、肺胞II型上皮細胞層を除去する際に、一部失われた基底膜の欠損窓から、下部のコラーゲン線維(白抜き太矢印)が垣間見える(スケールの長さは $1\mu\text{m}$ )。これらの結果から、2-アセトアミド-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコピラノース非還元末端を有するPV-GlcNAcや $\beta$ -D-グルコピラノース非還元末端を有するPV-CAやPV-Lamでコーティングした高密度コラーゲン線維支持体(GlcNA

c-fib\*, CA-fib\*, Lam-fib\*) 上で培養すると、肺胞II型上皮細胞層の直下に基底膜が形成された肺胞上皮組織が構築されることを確認した。また、 $\beta$ -D-ガラクトピラノース非還元末端を有するPV-LAに対して、肺胞II型細胞は接着するが(図5)、基底膜は形成されなかった(図6及び図7)。このことは、糖鎖に対する細胞接着は、基底膜形成の必要条件ではあっても、十分条件ではないことを示している。

#### 【0040】

##### 4-3 (マトリゲルによる基底膜形成を促進する効果)

図1のT2-fib-MGに示した様に、下部ウェルにマトリゲル200 $\mu$ lをコーティングし、高密度コラーゲン線維(fib)上で肺胞上皮細胞を2週間培養すると上皮細胞直下に基底膜が形成される。しかし、マトリゲルの量が50 $\mu$ lに満たないと基底膜は形成されない(J. Cell Sci., 113: 589-868, 2000)。この場合にあっても、実施例3に示した方法で高密度コラーゲン線維(fib)を作製し、実施例4に示した方法でPV-GlcNAc, PV-CA又はPV-Lamでコーティングした培養基質(fib\*)を用いると、10日間培養で肺胞II型上皮細胞層直下に基底膜が形成される。図8には、種々のPV-sugarをコーティングした高密度コラーゲン線維(fib\*)上で、培養皿底面にコーティングした25 $\mu$ lマトリゲルと10日間共培養し、形成した上皮組織の透過型電子顕微鏡写真(左側:未処理、及びPV-GlcNAc, PV-CAコーティング)、及び実施例5(後述)に示す方法で肺胞上皮細胞層を除去し、直下の基底膜構造体を表面に露出させ走査型電子顕微鏡で撮影した(右側:未処理、及びPV-GlcNAc, PV-CAコーティング)結果が示されている(記号の意味及びスケールは実施例4-2と同じ。)。これらの結果から、マトリゲルの量が不十分の場合でも、PV-GlcNAc又はPV-CAでコーティングした高密度コラーゲン線維支持体(GlcNAc-fib\*, CA-fib\*)を用いることにより、肺胞II型上皮細胞層の直下に基底膜が形成された肺胞上皮組織が構築されることを確認した。

#### 【0041】

##### 4-4 (ヒト肺動脈血管内皮細胞による基底膜の調製)

ヒト肺動脈血管内皮(HPAE)細胞を、図2に示した方法で培養した。すな

わちヒト線維芽細胞を包埋したコラーゲングル (Fgel) 上に直接培養 (EC-Fgel)、Fgel 共存下で高密度コラーゲン線維 (fib) 上に培養 (EC-fib-Fcm)、200  $\mu$  l のマトリゲルと共に fib 上で共培養 (EC-fib-MG)、及び fib 上で培養 (EC-fib) した。培養後、表面の HPAE 細胞層を実施例 5 (後述) の方法で除去し、細胞直下の細胞外基質構造を走査型電子顕微鏡で観察した (図 9)。EC-Fgel の場合は基底膜が形成されたが、EC-fib-Fcm, EC-fib-MG, EC-fib の場合には既存のコラーゲン線維が露出し、T2 細胞の場合 (T2-fib-Fcm, T2-fib-MG) の様に基底膜は形成されなかった (白抜き太矢印はコラーゲン線維。\* はコラーゲン線維間に沈着した分泌物。スケールの長さは 1  $\mu$  m。)。そこで、EC-fib-Fcm の培養系を用いて、実施例 5 の肺胞 II 型上皮細胞の場合と同様に、PV-sugar をコーティングした高密度コラーゲン線維支持体 (fib\*) 上で培養した。培養後、表面の HPAE 細胞層を実施例 5 の方法で除去し、露出した細胞直下の細胞外基質構造を、走査型電子顕微鏡で観察した (図 10)。PV-GlcNAc, PV-CA コーティングの場合に、基底膜の形成が認められた。PV-Lam コーティングの場合には、基底膜の形成が不完全だった。PV-sugar 未処理 (Cont) 及び PV-LA, PV-MA, PV-Man, PV-MEA 処理では、既存のコラーゲン線維 (白抜き太矢印) に上皮細胞の分泌物が集積 (\*) しているが、基底膜は形成していない。これらの結果から、PV-GlcNAc, PV-CA コーティングした fib\* (GlcNAc-fib\*, CA-fib\*) を用いると、ヒト肺動脈血管内皮細胞層の直下に基底膜が形成されたヒト肺動脈内皮組織が構築されることを確認した。

#### 【0042】

実施例 5 (肺胞上皮細胞層が除去され、基底膜が露出した基底膜標品の作製)

組織モデル (T2-fib-MG) から、図 4 に模式的に示されているように、II 型肺胞上皮細胞層を剥離し、基底膜が露出した基底膜標品を作製し、作製した基底膜構造体上に、ラット気道上皮細胞又はヒト肺動脈血管内皮細胞を播種し、気道上皮組織や血管上皮組織を作製した。まず、カルチャーインサートの上部ウェルの II 型肺胞上皮組織に、蛋白分解酵素阻害剤の混合液 (PIC、ペプチド研究所社製、大阪) を添加した等張のリン酸緩衝液 (pH 7.2; PBS (-)) 中で、0.1% のトリトン X-100 (界面活性剤) 2 ml を用いて、上皮細胞の脂質

成分を溶解・溶出すると同時に、共存する 50 mM  $\text{NH}_3$  で、細胞の基底膜表面に残存する蛋白質を溶解する操作を 2 回（基底膜の蛋白までは溶かしてはならない）繰り返した後、再度 PIC を含む PBC（－）溶液で基底膜から界面活性剤とアルカリ洗浄をすることによって、肺胞上皮細胞層を剥離して基底膜が露出した基底膜標品を作製した。

#### 【0043】

実施例 6（基底膜構造体上でのラット気道上皮組織の再構築）

実施例 5 で構築した基底膜構造体上に、ラット気道上皮細胞株（SPOC1、米国 NIES より供与）を  $5 \times 10^5$  個播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  存在下、10 mM の HEPES（pH 7.2）と 1% FBS を添加した、Ham's F12：DMEM = 1：1 の混合培地中で 1 週間培養して、気道上皮組織を構築した。基底膜構造体上に構築された気道上皮組織の透過型電子顕微鏡写真を図 11 として示す。図 11 A は基底膜構造体上の気道上皮細胞を示し、図 11 B は気道上皮細胞が肺胞上皮細胞由来の基底膜を認識してアンカリングフィラメントで繋がっている、気道上皮細胞の基底面と基底膜構造体との強拡大の境界面を示し、図 11 C は細胞－細胞間結合で気道上皮細胞同士が結合して上皮組織を形成していることを示している。

#### 【0044】

実施例 7（基底膜構造体上でのヒト血管上皮組織の再構築）

実施例 5 で構築した基底膜構造体上に、ヒト肺動脈血管内皮細胞（クローンテック社製）を  $5 \times 10^5$  個播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  存在下、10 mM の HEPES（pH 7.2）と 2% FBS を添加した、MCDB 131：DMEM = 1：1 の混合培地中で 2 週間培養して、ヒト血管上皮組織を構築した。基底膜構造体上に構築されたヒト血管内皮組織の透過型電子顕微鏡写真を図 12 として示す。図 12 A には線維芽細胞との共培養により構築したヒト血管上皮組織を、図 12 B にはマトリゲル共存下で構築したヒト血管上皮組織を示している。

#### 【0045】

実施例 8（プラスチック表面から剥離した、基底膜の構造が保持された人工組織の構築）

反応基を有する疎水結合性吸着ポリマーとして、メチルビニルエーテルと無水マレイン酸との交互共重合体MMACを用いた。MMACは99.5%エタノールに溶解し、濃度 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のMMAC溶液を得た。このMMAC溶液を、6穴培養皿用カルチャーインサート（ベクトンディッキンソン社製）に0.5ml注ぎ、余分な溶液を取り除いた後風乾した。この操作を所望する仮接着の程度に応じて1～3回繰り返し、カルチャーインサート底面のPET膜表面をMMACでコーティングした。次いで、上記表面コーティングPET膜に、実施例2で調製した肺線維芽細胞を含むコラーゲン溶液またはコラーゲンのみの溶液0.72mlを載置し、CO<sub>2</sub>インキュベータで1時間または数時間～24時間インキュベートし、PET膜表面に肺線維芽細胞マトリックス基層（Fgel）または高密度コラーゲン線維（fib）を仮接着した。この線維性コラーゲン基層上で実施例3と同様にして、肺胞II型上皮細胞（T2）を播種し2週間培養して（T2-Fgel、またはT2-fib-FcmやT2-fib-MG）、人工肺胞上皮組織を構築した。この人工肺胞上皮組織をスパチュラを用いてPET膜から機械的に剥離したところ、基底膜の構造が保持された人工肺胞上皮組織が得られた。

#### 【0046】

##### 【発明の効果】

本発明によると、基底膜や人工組織作製時にはプラスチック表面に接着しているが、所望時にプラスチック表面から人工組織や基底膜標品を担持したタンパク性支持体を物理的に剥離させることができ、剥離された人工組織や基底膜標品を担持したタンパク性支持体は、基底膜の構造を保持したままで移植が可能となり、人工血管、人工肺、人工肝、人工腎臓、人工皮膚、人工角膜等としての再生医療材料として有用である。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

肺胞上皮細胞による基底膜形成を示す模式図である。

##### 【図2】

肺動脈内皮細胞による基底膜形成を示す模式図である。

##### 【図3】

上皮細胞と内皮細胞の共培養による基底膜の形成を示す模式図である。

【図 4】

再構成基底膜標品を用いた内皮組織や上皮組織の構築を示す模式図である。

【図 5】

肺胞II型細胞の糖鎖接着の特異性を示す図である。

【図 6】

肺胞II型上皮細胞を種々のPV-sugarをコーティングした高密度コラーゲン線維（f i b \*）上で2週間培養した結果形成された肺胞上皮組織の透過型電子顕微鏡写真を示す図である。

【図 7】

肺胞II型上皮細胞を種々のPV-sugarをコーティングした高密度コラーゲン線維（f i b \*）上で2週間培養した結果形成された肺胞上皮組織直下の細胞外基質の走査型電子顕微鏡写真を示す図である。

【図 8】

肺胞II型上皮細胞を種々のPV-sugarをコーティングした高密度コラーゲン線維（f i b \*）上で、培養皿底面にコーティングした25  $\mu$  lマトリゲルと10日間共培養した結果形成された肺胞上皮組織の透過型電子顕微鏡写真（左）と肺胞上皮組織直下の細胞外基質の走査型電子顕微鏡写真（右）を示す図である。

【図 9】

図2の培養方法によるヒト肺動脈血管内皮細胞の基底膜形成の結果を示す細胞外基質の走査型電子顕微鏡写真を示す図である。

【図 10】

種々のPV-sugarをコーティングした高密度コラーゲン線維（f i b \*）上にヒト肺動脈血管内皮細胞を播種し、肺線維芽細胞を包埋したコラーゲングルと2週間共培養した（EC-fib\*-Fcm）結果形成された血管内皮細胞層直下の細胞外基質の走査型電子顕微鏡写真を示す図である。

【図 11】

基底膜構造体上に構築された気道上皮組織の透過型電子顕微鏡写真を示す図である。

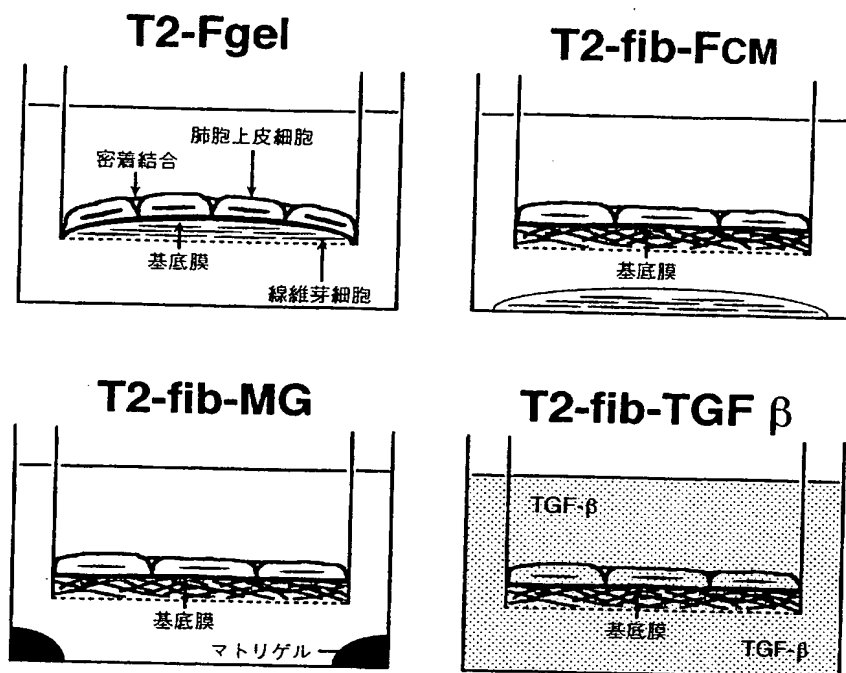


【図 1 2】

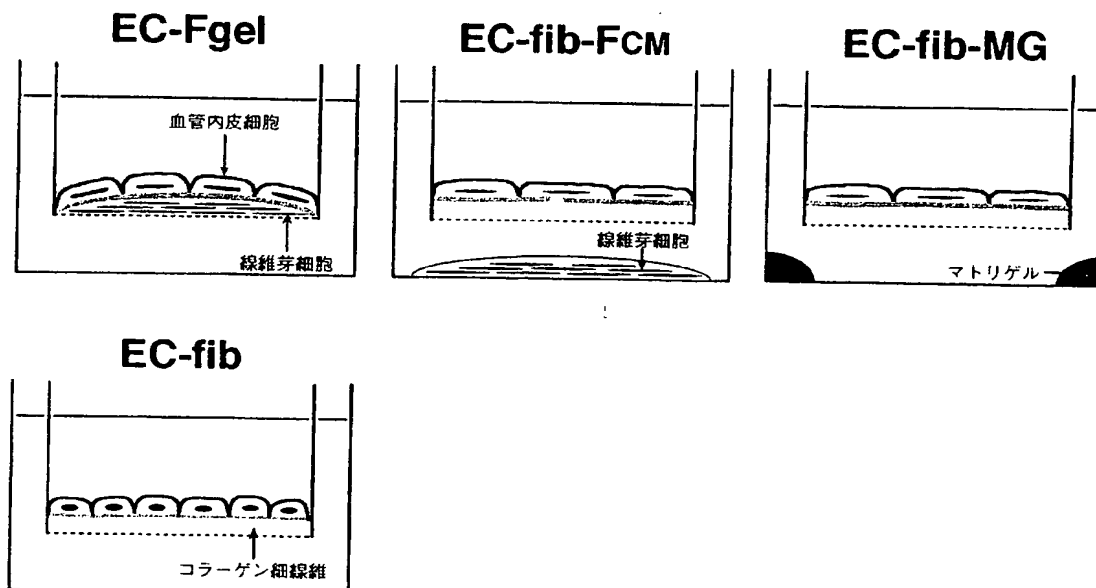
基底膜構造体上に構築されたヒト血管内皮組織の透過型電子顕微鏡写真を示す図である。

【書類名】 図面

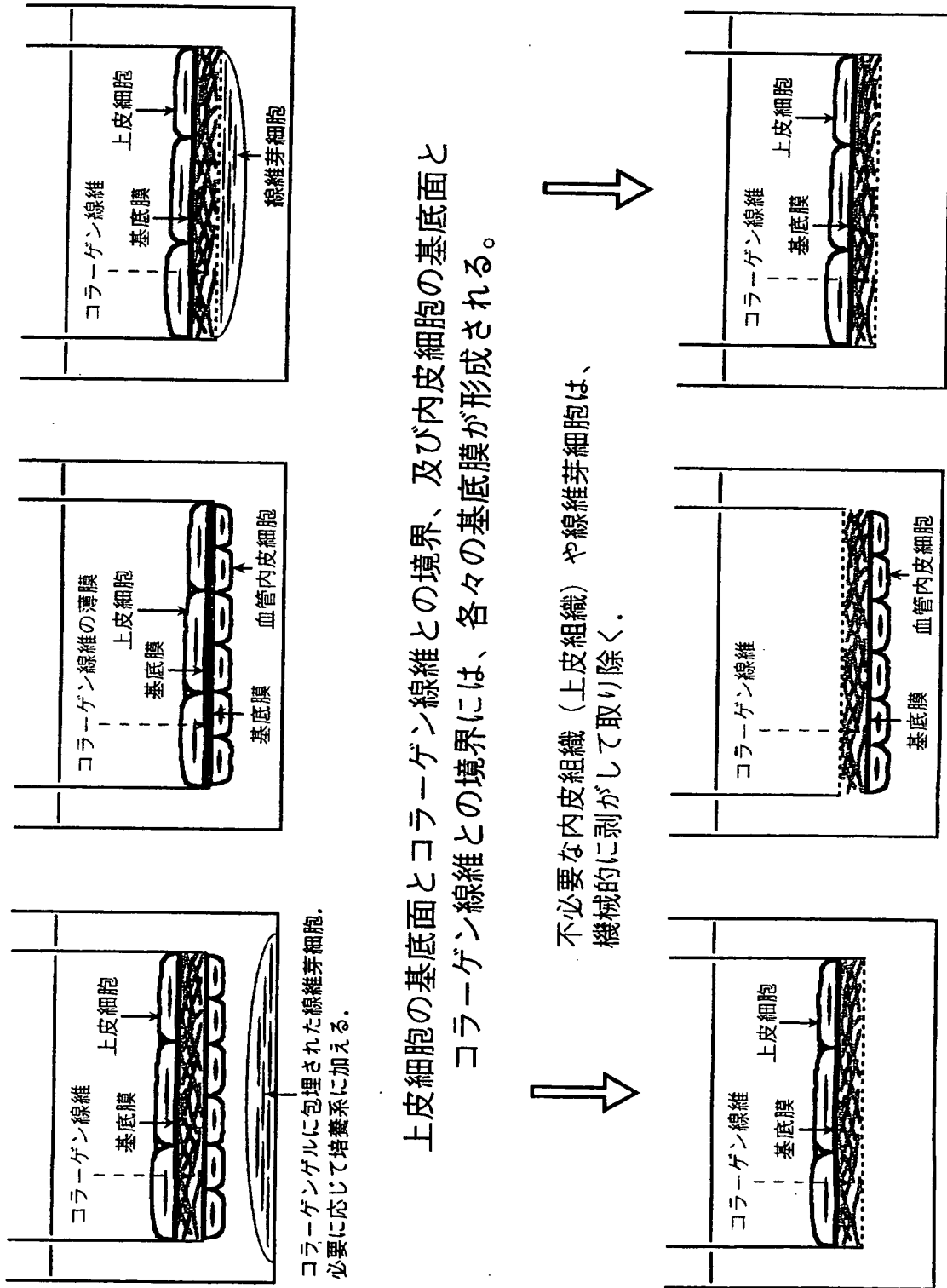
【図 1】



【図 2】



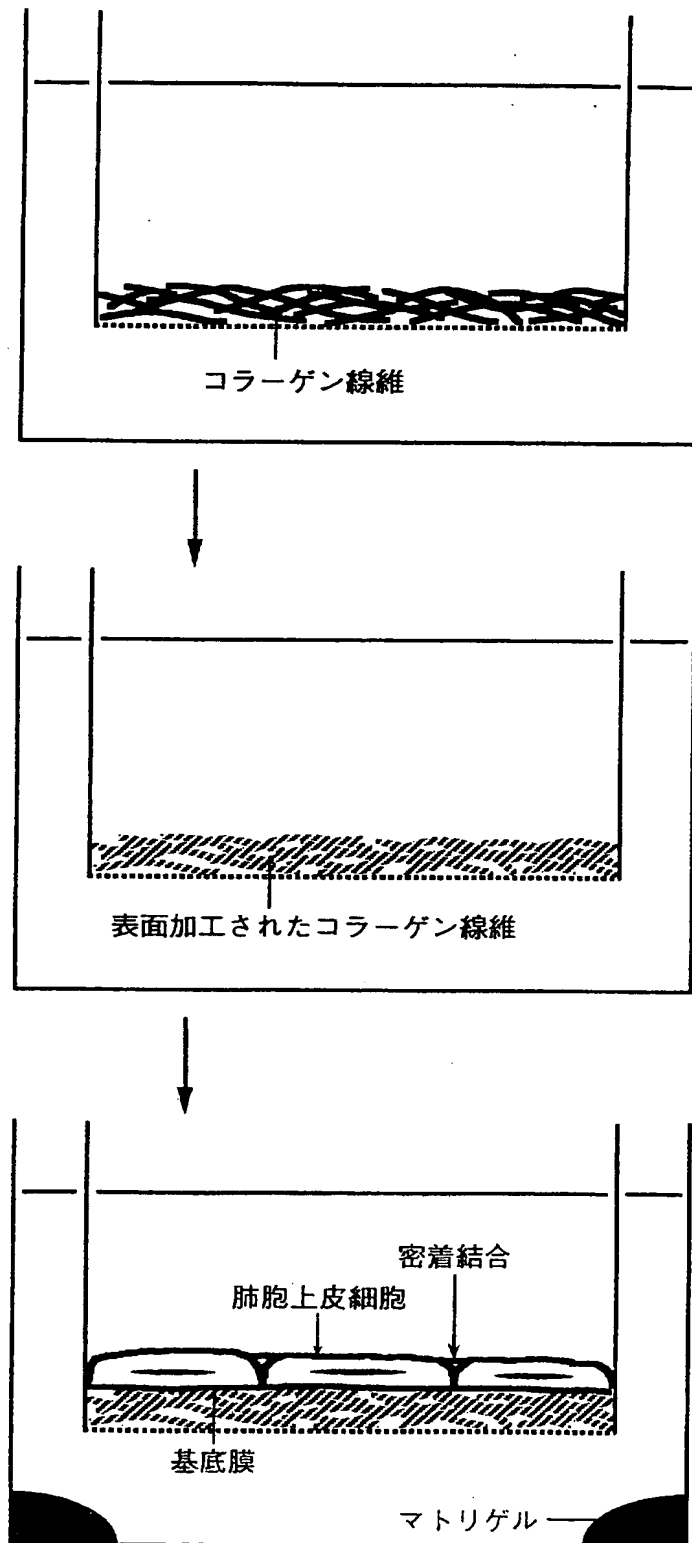
【図 3】



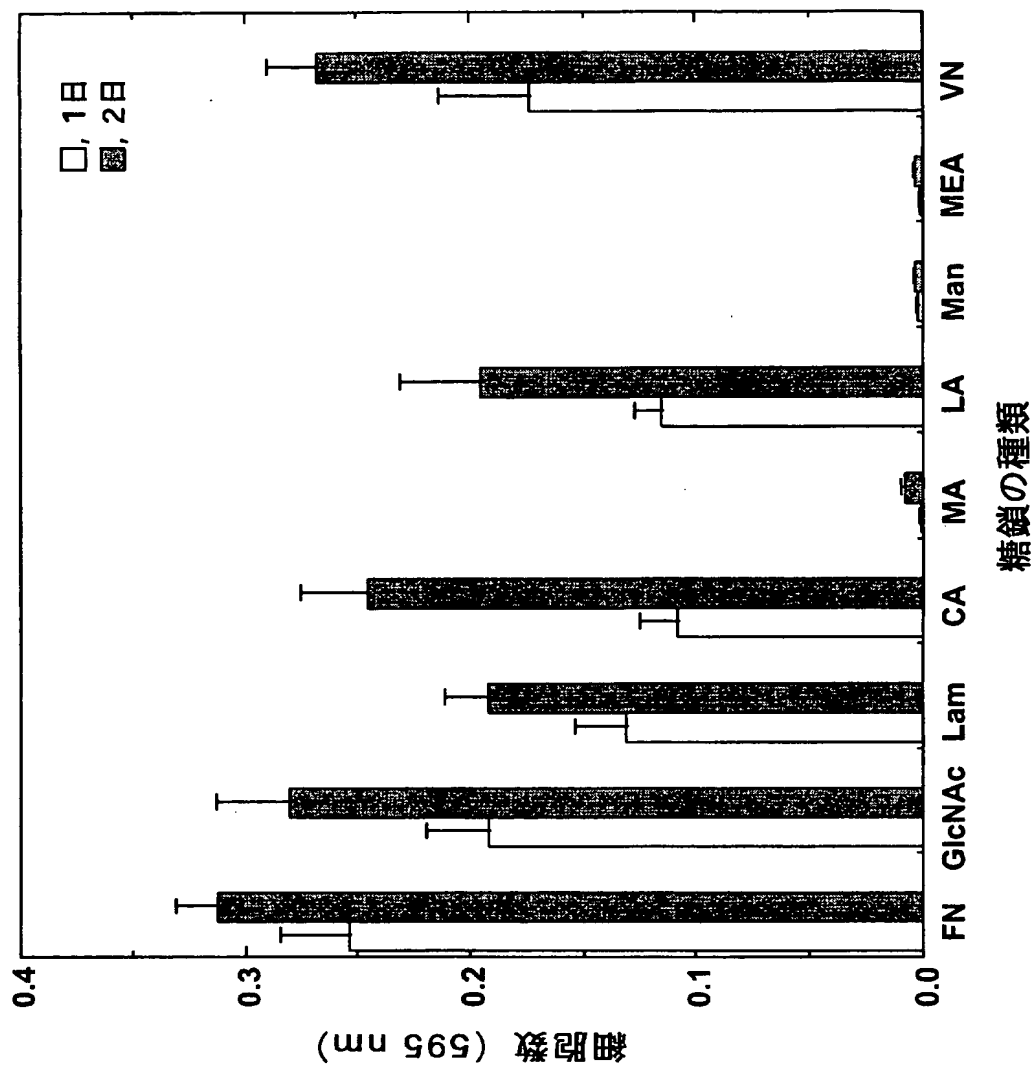
上皮細胞の基底面とコラーゲン線維との境界、及び内皮細胞の基底面とコラーゲン線維との境界には、各々の基底膜が形成される。

不要な内皮組織（上皮組織）や線維芽細胞は、機械的に剥がして取り除く。

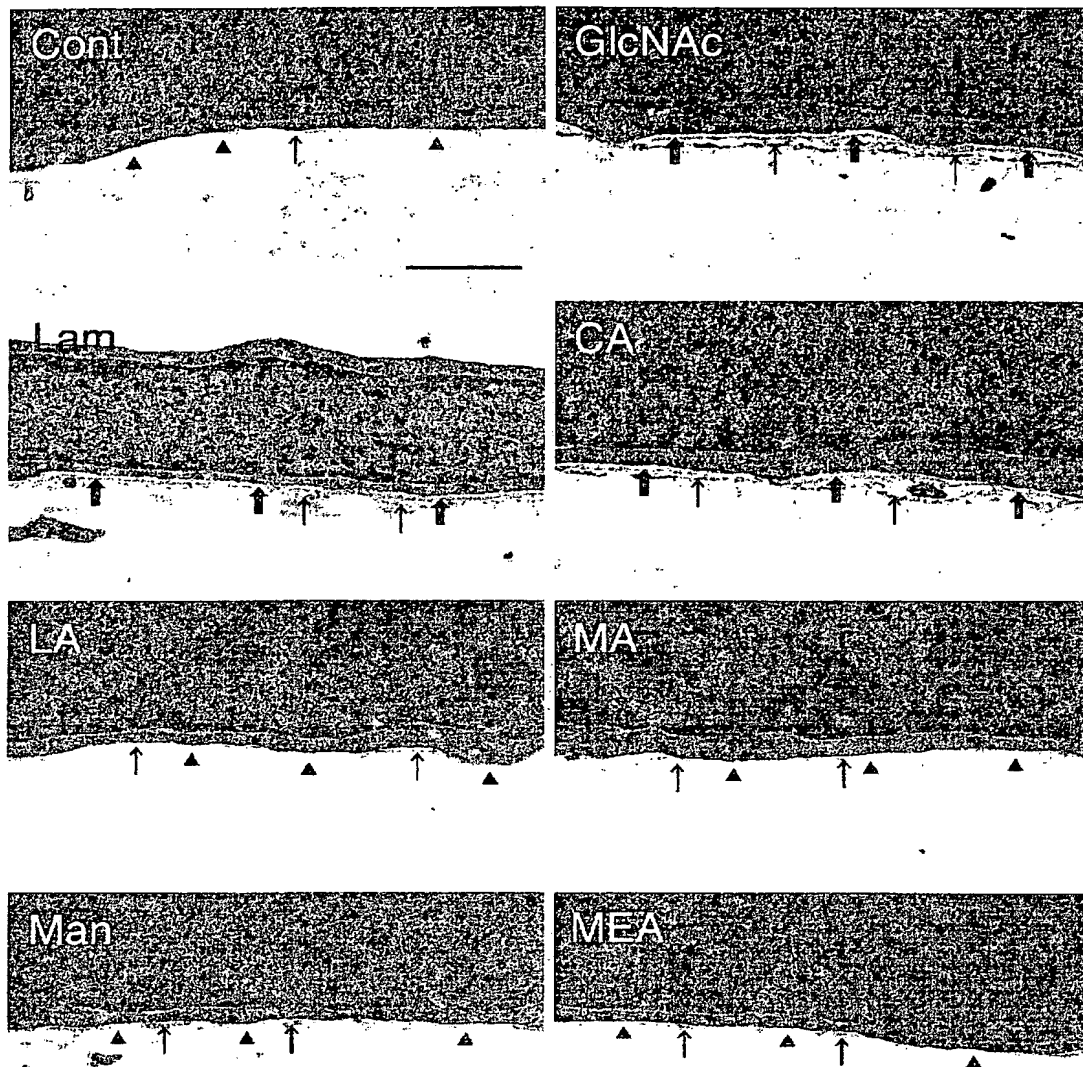
【図 4】



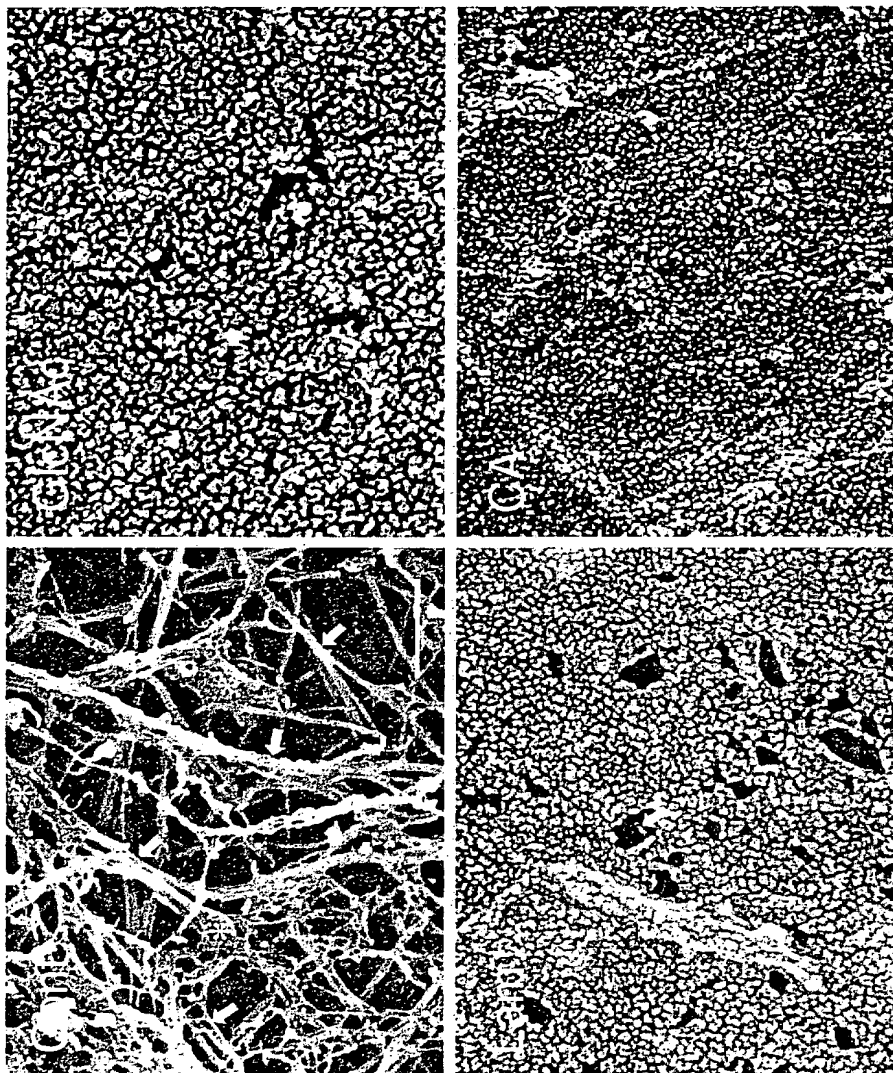
【図 5】



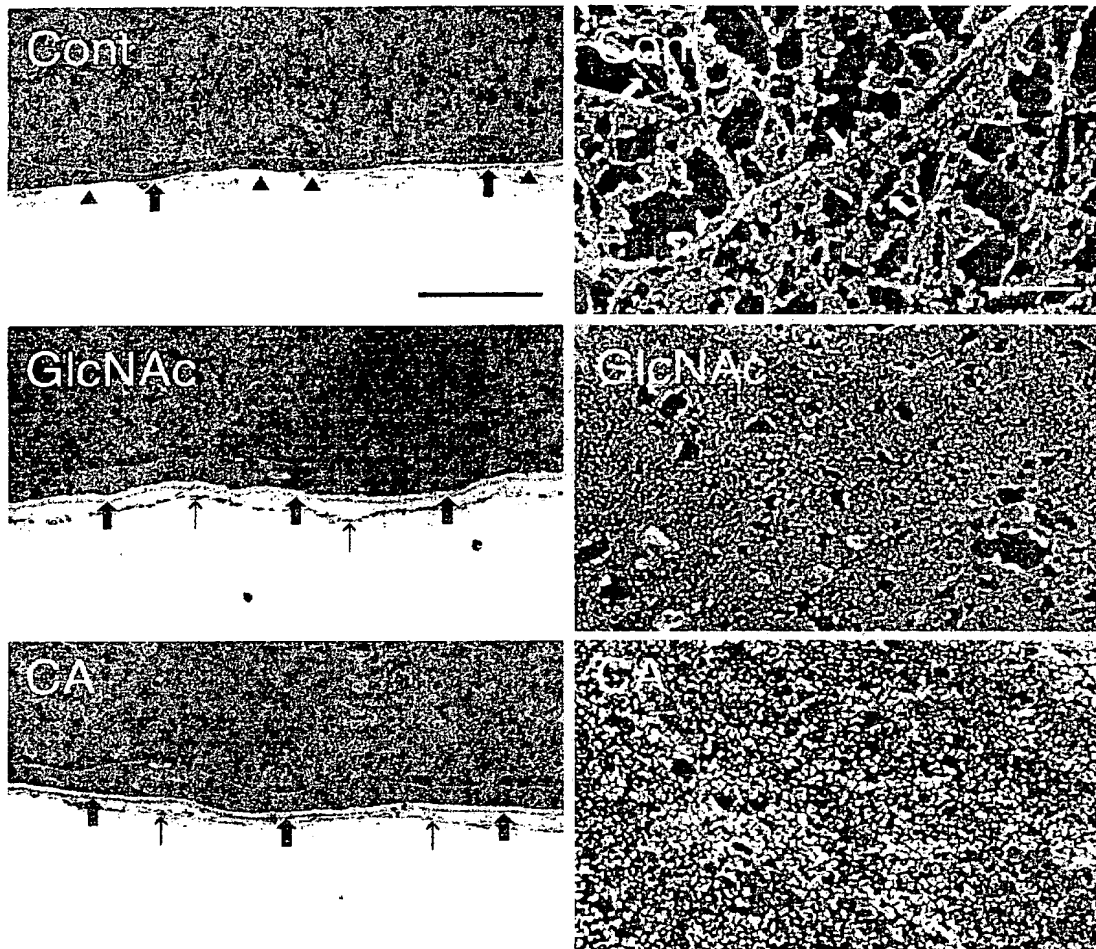
【図 6】



【図 7】

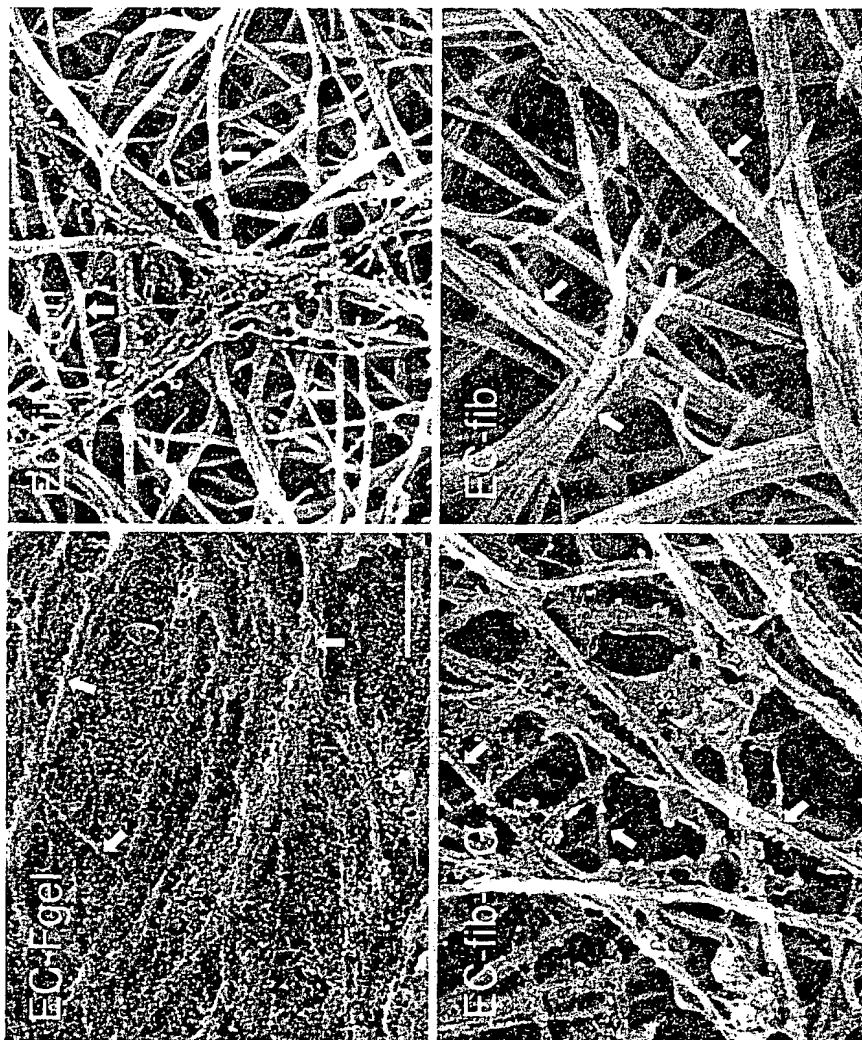


【図 8】

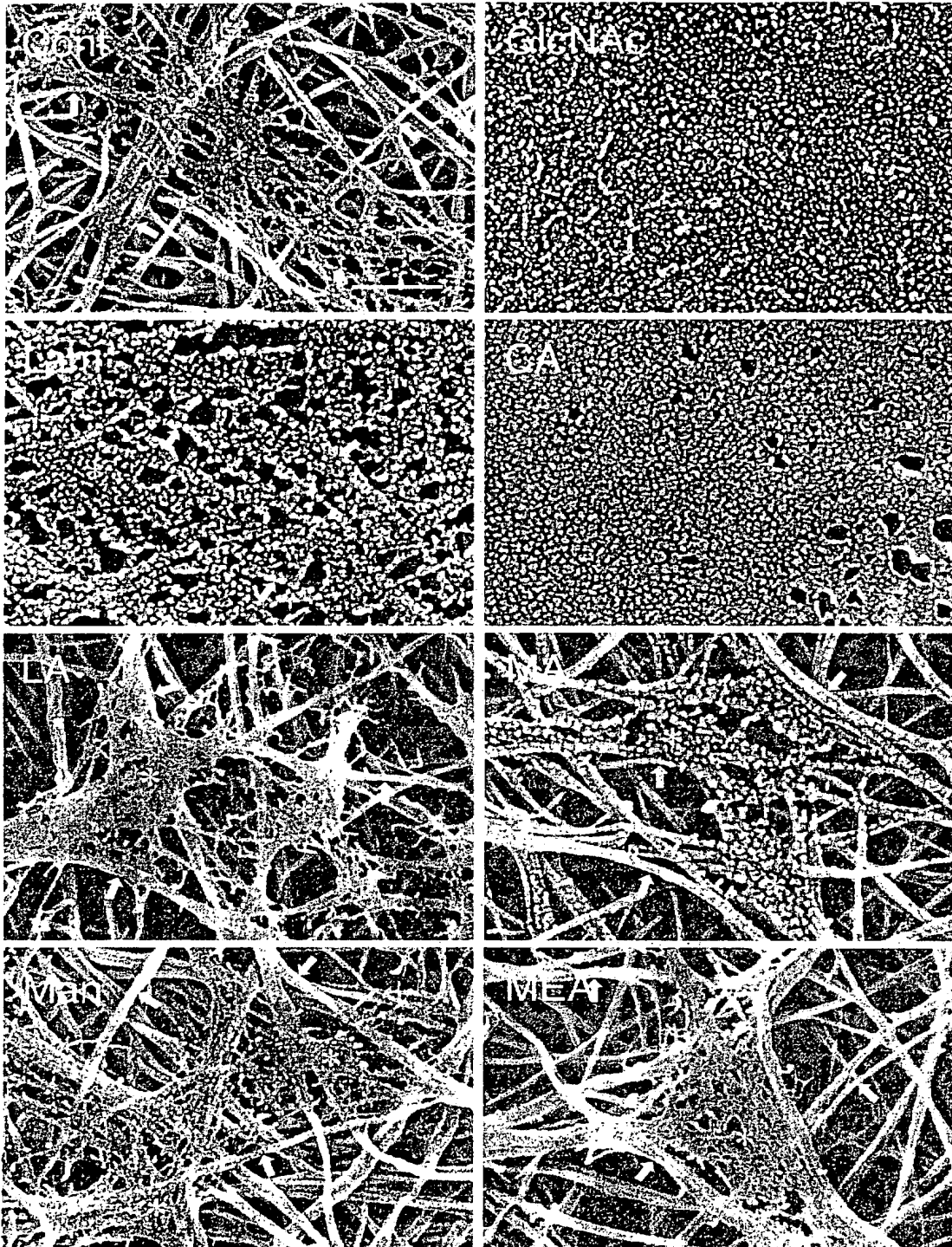




【図 9】

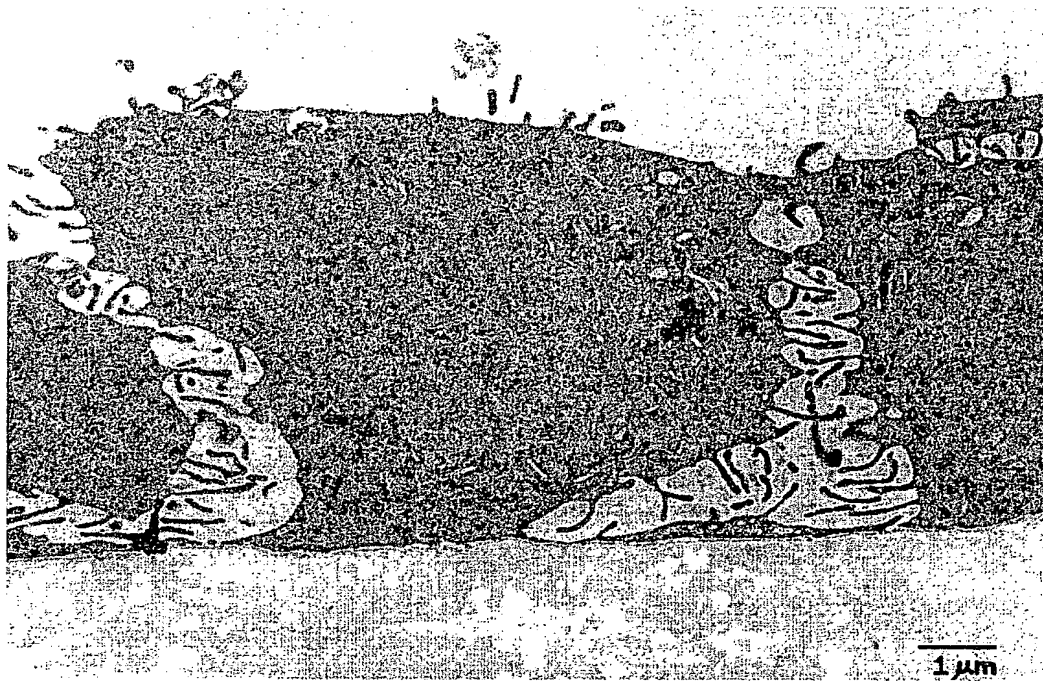


【図 10】

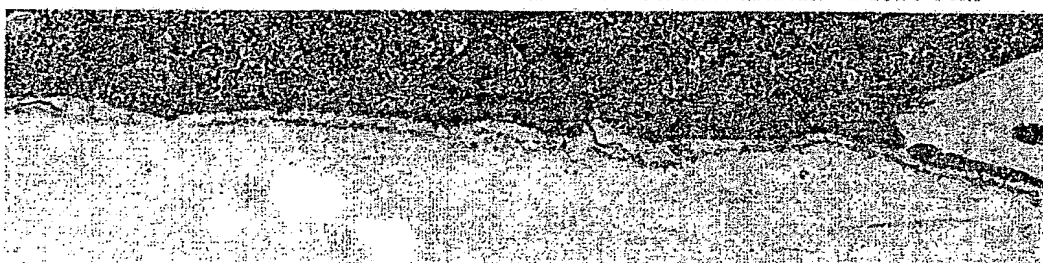


【図 11】

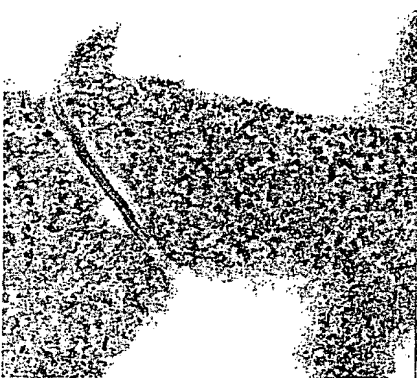
A



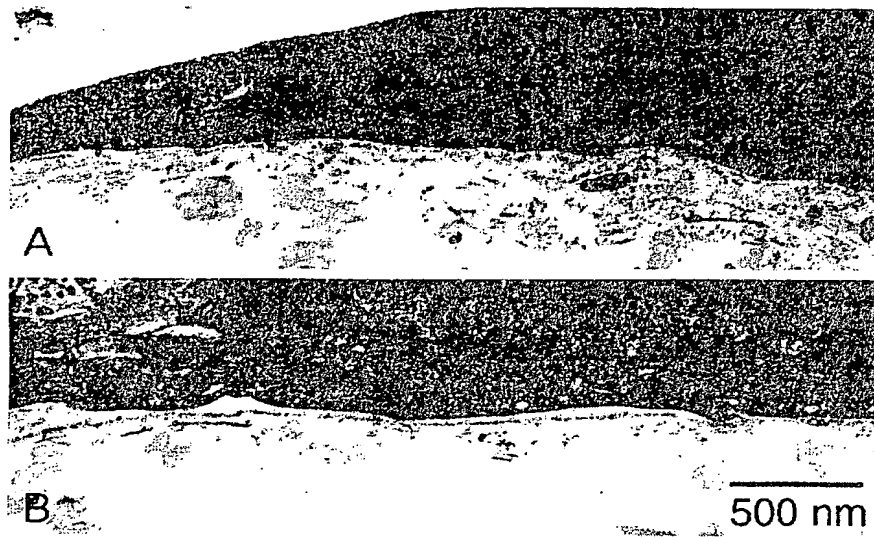
B



C



【図 12】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 基底膜や人工組織の調製時にはプラスチック表面に吸着・固定しているが、所望時にはプラスチック表面から物理的に剥離させることができるように仮接着しているタンパク性支持体上に形成されており、基底膜の構造を保持したままで移植が可能なことから、その汎用性が一層高い基底膜標品や人工組織を提供すること。

【解決手段】 メチルビニルエーテルと無水マレイン酸との交互共重合体等の分子内に疎水性を有する直鎖状炭素骨格とタンパク質と反応しうる官能基とを有する疎水結合性吸着ポリマーを介して、プラスチック表面にタンパク性支持体を仮接着し、その上に基底膜標品又は人工組織を形成させ、所望時にプラスチック表面から基底膜標品又は人工組織を担持したタンパク性支持体を物理的に剥離させ、基底膜の構造を保持したままで移植可能な基底膜標品又は人工組織を調製する。

特願 2 0 0 1 - 2 9 2 6 7 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 9 6 0 2 0 8 0 0 ]

1. 変更年月日

1 9 9 8 年 2 月 2 4 日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名

科学技術振興事業団

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**